



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**PROTEÍNAS DE LARVAS DE *Tenebrio molitor* (L., 1758): EXTRAÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NUM PRODUTO ALIMENTAR**

SARA MACHADO COSTA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Rui José Branquinho de Bessa

Doutor Mário Alexandre Gonçalves Quaresma

Eng.^a Carla Maria Feio Pires

ORIENTADORA

Eng.^a Carla Maria Feio Pires

CO-ORIENTADOR

Doutor António Salvador Ferreira

Henriques Barreto

2017

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**PROTEÍNAS DE LARVAS DE *Tenebrio molitor* (L., 1758): EXTRAÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NUM PRODUTO ALIMENTAR**

SARA MACHADO COSTA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Rui José Branquinho de Bessa

Doutor Mário Alexandre Gonçalves

Quaresma

Eng.^a Carla Maria Feio Pires

ORIENTADORA

Eng.^a Carla Maria Feio Pires

CO-ORIENTADOR

Doutor António Salvador Ferreira Henriques

Barreto

2017

LISBOA

DEDICATÓRIA:

Dedico esta tese à minha filha LAURA que nasceu no primeiro ano deste Mestrado e que foi a minha inspiração para a escolha deste tema para a dissertação.

A escolha deste tema foi na tentativa de criar oportunidades, em termos futuros, para ti e para que tenhas opções em termos de sustento.

Querida Laura, peço-te desculpa:

Pelos minutos que ficaste a chorar no quarto para eu poder estudar,

Pelas horas que ficaste a brincar sozinha para eu poder escrever a dissertação,

Pelos fins-de-semana que não estive contigo para poder fazer o trabalho prático,

Pelos dias que tive falta de paciência,

Por todos aqueles momentos em que não te dei atenção quando me pedias,

Por ter perdido um pouco do teu crescimento, das tuas conquistas e dos momentos que deveriam ter sido só nossos,

Por ter estado longe de ti...

Por tudo isto peço desculpa!

E dedico-te esta tese porque ela também é uma conquista tua, o resultado do meu e do teu sacrifício!

AGRADECIMENTOS:

Depois de muitas reticências, suor, lágrimas e noites em claro finalmente digo: “Consegui!”

É um grande desafio exprimir por palavras o que me vai na alma e agradecer a todas as pessoas que me motivaram, apoiaram, ajudaram e me deram a mão nos momentos difíceis que surgiram no decurso deste trabalho.

Ao meu marido, Bruno Marques, quero deixar um grande e emocionado “OBRIGADO” por teres acreditado em mim, por me teres apoiado na inscrição deste mestrado, por teres ficado sozinho com a nossa filha desde que ela tinha uma semana de vida para eu poder ir às aulas e aos exames, por teres ficado inúmeros fins-de-semana sozinho a aguentar com todas as tarefas e por, durante dois anos, teres aceite sacrificar o teu tempo livre.

À minha mãe, por teres descido para Lisboa várias semanas ao longo de um ano para cuidar da Laura para eu puder concluir o ano curricular.

À minha grande amiga Patrícia Oliveira, por todo o apoio, positivismo, por todas as horas de desabafo, e pela ajuda e orientação no decurso do trabalho no laboratório da microbiologia e pelos sacrifícios em ficar a aguentar o barco sozinha para eu puder concluir a tese.

À minha querida orientadora Carla Pires, por ter acreditado em mim e no tema que escolhi para a dissertação, por todas as horas despendidas a ensinar-me e a apoiar-me na execução do trabalho, pela paciência e persistência quando as coisas correram menos bem, pela prontidão e apoio durante a elaboração da dissertação e por estar ao meu lado nas situações mais complicadas.

Ao Dr. Rui Nunes e Dr. Daniel Murta da empresa Ingredient Odyssey, Lda por terem-me disponibilizado as larvas de *Tenebrio molitor* para a execução deste trabalho.

À minha amiga Patrícia Fradinho, pelo apoio e auxílio fornecido na análise das propriedades reológicas, assim como à Dr.^a Anabela Raymundo por ter disponibilizado o equipamento para a realização das análises.

À minha atual chefe, a Dr.^a Sónia Pedro, pela disponibilidade em orientar-me, ensinar-me e apoiar-me na execução do trabalho prático na microbiologia e por ter-me disponibilizado algum tempo para a conclusão da dissertação.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. António Barreto, pelo apoio e compreensão no decurso da elaboração deste trabalho.

À minha antiga colega de trabalho, Margarida Freire, pelo apoio e motivação no decurso do trabalho.

À Dr.^a Narcisa Bandarra agradeço o apoio, conhecimentos transmitidos e disponibilidade para a realização das análises no laboratório dos lípidos e sugestões feitas.

Um especial agradecimento ao Eng. Irineu Batista por ter auxiliado na resolução de alguns problemas no decurso do trabalho prático.

À Dr.^a Helena Lourenço agradeço o apoio e disponibilidade para a realização das análises de determinação do teor de contaminantes.

“At last but not at least”, um especial obrigado aos meus amigos, em particular, ao Rui Oliveira e Lia Godinho por todo o apoio e motivação que sempre me deram.

RESUMO:

PROTEÍNAS DE LARVAS DE *Tenebrio molitor* (L., 1758): EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO NUM PRODUTO ALIMENTAR.

A mudança no regime alimentar das populações dos diferentes países, potenciou o desenvolvimento dos regimes intensivos de produção que resultou em efeitos negativos sobre o meio ambiente levando à necessidade de se encontrarem fontes alternativas de proteína para sustentar a população humana no futuro. Uma das alternativas seriam as proteínas de insetos uma vez que a sua produção é sustentável, de baixos custos e com menor impacto negativo sobre o meio ambiente. Assim, o objetivo desta dissertação consistiu, em primeiro lugar, na avaliação nutricional e determinação do teor dos principais contaminantes (químicos e microbiológicos) das larvas de *Tenebrio molitor* e, posterior extração e caracterização nutricional e funcional das proteínas extraídas dessas larvas. Foi também objetivo a incorporação destas proteínas num produto alimentar.

As larvas de *Tenebrio molitor* apresentam um elevado teor proteico (18%) e lipídico (10%) e são uma fonte de aminoácidos essenciais e ácidos gordos, equiparada a outras fontes de proteína animal. Estas larvas apresentam ainda um baixo teor de contaminantes químicos e, apesar da elevada carga microbiana e não foi detetada a presença das bactérias patogénicas. As condições de extração que permitiram obter proteínas de *Tenebrio molitor* com melhores propriedades funcionais foram: solubilização a pH 12, proporção de larvas:água 1:20, temperatura de solubilização de 20 °C com 30 min de agitação e precipitação a pH 4. Estas proteínas apresentam um teor de proteína e gordura entre 10 a 12% e propriedades funcionais semelhantes a proteínas de origem animal e vegetal. Para além disso são uma excelente fonte dos aminoácidos essenciais histidina, treonina, fenilalanina e tirosina. Estas características tornam estas proteínas um excelente ingrediente para produtos alimentares.

A incorporação das proteínas extraídas em bolachas de manteiga resultou num aumento do teor proteico e lipídico do produto, conferindo-lhes uma cor mais escura e tonalidade mais avermelhada. Em termos sensoriais, as bolachas com proteínas extraídas de *Tenebrio molitor* obtiveram na maioria dos parâmetros avaliados um índice de satisfação de pelo menos 80% e o painel demonstrou que teria a intenção de adquirir este produto com alguma frequência.

Palavras-chave: Proteína, *Tenebrio molitor*, Composição nutricional, Extração, Propriedades funcionais, Bolachas

ABSTRACT:

***Tenebrio molitor* (L., 1758) PROTEIN LARVAE: EXTRACTION, CHARACTERIZATION AND FOOD PRODUCT APPLICATION.**

The triggering to find alternative sources of animal protein to sustain the human population has been induced by the negative environmental impact in result of the animal intensive production system. Insects have suitable proteins and its production is sustainable, with lower cost and impact in the environment.

The objective of this work was, primarily, the nutritional evaluation and quantification of chemical and microbiological contaminants of *Tenebrio molitor* larvae. Thereafter, extraction and nutritional and functional characterization of *Tenebrio molitor* protein was performed, following by their incorporation to a food product.

Tenebrio molitor larvae presented high proteic (18%) and lipidic (10%) content and, comparatively to other sources of animal protein, they are a good source of essential amino acids and fatty acids. They presented low content of chemical contaminants and despite the high microbiological count, no pathogenic bacteria's were detected.

Tenebrio molitor protein optimum extraction conditions were: solubilization at pH of 12, larvae:water ratio of 1:20 and 30 min of stirring at 20°C of temperature, followed by the precipitation at pH 4. The protein extracted had a proteic and lipidic content about 10 to 12% and they presented functional properties similar to other animal and vegetal proteins. These properties together with their high essential amino acids content make them suitable as a food ingredient. Although resulted in a darker and reddish cookie, the incorporation of *Tenebrio molitor* protein in butter cookies, an increase of proteic and lipidic content was observed. Sensorial evaluation revealed that these cookies had 80% score in all parameters and the panelist had the intention to acquire this product.

Key words: protein, *Tenebrio molitor*, proximate composition, extraction, functional properties, Cookies

Índice Geral

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Alimento vs crescimento da população mundial	1
1.2. Entomofagia como alternativa	1
1.3. Porque é a Entomofagia uma alternativa para a alimentação humana e animal?	2
1.4. Consumo de insetos	5
1.5. Produção em massa de insetos	6
1.6. Riscos associados ao consumo de insetos	7
1.6.1.Potencial alergénico	7
1.6.2.Riscos microbiológicos	8
1.6.3.Riscos químicos	9
1.7. <i>Tenebrio molitor</i>	9
1.7.1.Composição proximal	11
1.7.2.Teores de quitina	11
1.7.3.Perfil de aminoácidos	13
1.7.4.Perfil de ácidos gordos	15
2. Objectivos	18
3. MATERIAL E METODOLOGIAS	19
3.1 Larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	19
3.2 Composição proximal	19
3.2.1Determinação do teor de humidade (NP 2282, 2009)	19
3.2.2Determinação do teor de cinza (NP 2032, 2009)	19
3.2.3Determinação do teor de gordura	20
3.2.4Determinação do teor de proteína	20
3.2.5Determinação do teor de quitina (Gamage & Shahidi, 2007)	21
3.3 Perfil de ácidos gordos	21
3.4 Determinação da classe de lípidos	22
3.5 Perfil de aminoácidos	22
3.6 Determinação da concentração de contaminantes químicos	23
3.7 Caracterização microbiológica	23
3.7.1 Contagem de bactérias aeróbias mesófilas totais.	24
3.7.2 Contagem de bactérias aeróbias e anaeróbias mesófilas formadoras de esporos.	24
3.7.3 Contagem de bolores e leveduras	24
3.7.4 Contagem de bactérias da família Enterobacteriaceae	24
3.7.5 Contagem de coliformes e <i>Escherichia coli</i>	25
3.7.6 Pesquisa e contagem <i>Listeria monocytogenes</i>	25
3.7.7 Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	25
3.7.8 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	25
3.8 Método de extração da proteína de <i>Tenebrio molitor</i>	26
3.9 Propriedades Reológicas das proteínas extraídas de <i>Tenebrio molitor</i>	27

3.10 Caracterização e determinação das propriedades funcionais da proteína extraída de <i>Tenebrio molitor</i>	28
3.10.1 Capacidade de absorção de água (WAC ou “water absorption capacity”).....	28
3.10.2 Capacidade de absorção de gordura (FAC ou “fat absorption capacity”)	28
3.10.3 Solubilidade proteica	29
3.10.4 Capacidade formação de espuma (FC ou “Foaming stability”) e estabilidade da espuma (FS ou “Foaming stability”).....	29
3.10.5 Índice de emulsificação (EAI ou “Emulsifying Activity Index”)	29
3.10.6 Filtração gel.....	29
3.10.7 Cor.....	30
3.11 Eletroforese em SDS-Page	30
3.12 Confeção de produtos alimentares com proteína extraída de <i>Tenebrio molitor</i>	30
3.13 Análise sensorial	32
3.14 Caracterização das bolachas com proteína extraída de <i>Tenebrio molitor</i>	32
3.14.1 Composição proximal.....	32
3.14.2 Cor.....	33
3.14.3 Propriedades texturais	33
3.15 Tratamento estatístico dos resultados	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Composição química e teor de contaminantes	34
4.2 Caracterização da Fração lipídica.....	35
4.3 Perfil de aminoácidos	38
4.4 Caracterização microbiológica das larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	39
4.5 Método de extração da proteína de <i>Tenebrio molitor</i>	43
4.6 Propriedades Reológicas das proteínas extraídas de <i>Tenebrio molitor</i>	47
4.7 Caracterização e determinação das propriedades funcionais da proteína extraída de <i>Tenebrio molitor</i>	49
4.8 Eletroforese SDS-PAGE	53
4.9 Justificação da escolha da metodologia a ser usada na extração das proteínas de <i>Tenebrio molitor</i>	56
4.10 Análise sensorial	57
4.11 Produção de salsichas tipo Frankfurt com proteínas extraídas de <i>Tenebrio molitor</i>	60
4.12 Caracterização das bolachas com proteína de <i>Tenebrio molitor</i>	61
5. CONCLUSÕES	65
6. BIBLIOGRAFIA.....	66
7. ANEXOS.....	72
Anexo 1 – Resultados de G' e G'' obtidos durante o aquecimento de 20°C a 90 °C e arrefecimento de 90 °C a 20 °C, para a proteína solubilizada a 20 °C e a 50 °C.	72
Anexo 2 - Resultados de G' e G'' obtidos durante a maturação e varrimento de frequência (espectro mecânico) a 5 °C, para a proteína solubilizada a 20 °C e a 50 °C.	73
Anexo 3 – Modelo da ficha de análise sensorial dos biscoitos.....	74
Anexo 4 – Modelo da ficha de análise sensorial das bolachas	75

Anexo 5 – Avaliação sensorial por parte do painel de provadores dos biscoitos com e sem a proteína extraída de <i>Tenebrio molitor</i> após solubilização a 20 °C e a 50 °C	76
Anexo 6 - Avaliação sensorial por parte do painel de provadores das bolachas sem e com a adição de 4% de Larvas de <i>Tenebrio molitor</i> e com a adição de 2% e 4% de proteína extraída de <i>Tenebrio molitor</i>	77
Anexo 7 - Avaliação sensorial por parte do painel de provadores das bolachas sem e com a adição de 8% de proteína extraída de <i>Tenebrio molitor</i>	79

Índice de Figuras

Figura 1 - Produção de carne de bovino, suíno, ave e de <i>Tenebrio molitor</i> , em termos de consumo de recursos ambientais e comparando com a percentagem de massa edível obtida.	4
Figura 2 - As quatro fases do ciclo de vida do <i>Tenebrio molitor</i>	10
Figura 3 - Composição proximal de <i>Tenebrio molitor</i> e de diferentes fontes de proteína animal	11
Figura 4 – Fluxograma do processo de extração da proteína de <i>Tenebrio molitor</i>	26
Figura 5 - TLC analítica e classes de Lípidos (% relativa) da fração lipídica de <i>Tenebrio molitor</i>	35
Figura 6 – Crescimento obtido nas placas de XLD e Rapid para a pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	40
Figura 7 – Crescimento obtido nas placas de Oxford e ALOA para a pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	40
Figura 8 – Resultado visual obtido nas placas de RB para a contagem de bolores se fungos.	41
Figura 9 – Resultado visual obtido nas placas de VRBGA para a contagem de Enterobacteriaceas.	41
Figura 10 – Resultado visual obtido nas placas de CHR para a contagem de coliformes totais.	42
Figura 11 – Resultado visual obtido nas placas de TBX para a contagem de <i>E. coli</i>	42
Figura 12 – Aspeto dos sobrenadantes e proteína resultante da precipitação a diferentes pH	45
Figura 13 – Proteína (húmida e liofilizada) de <i>Tenebrio molitor</i> obtida após a solubilização a 20 °C com 30 min de agitação e a 50 °C com 120 min de agitação, seguida da precipitação a pH 4.	46
Figura 14 – Resultados do tratamento efetuado às larvas de <i>Tenebrio molitor</i> , pela adição de ácido ascórbico e sulfito de sódio.	47
Figura 15 – Curvas de aquecimento e arrefecimento, cinética de maturação e espectro mecânico dos géis de proteína de <i>Tenebrio molitor</i> solubilizada a 20 °C e a 50 °C.	48
Figura 16 – Perfil por filtração gel das proteínas dos sobrenadantes de <i>Tenebrio molitor</i> resultantes da solubilização a 20 °C e a 50 °C.	52
Figura 17 – Imagem do gel de eletroforese obtido para as diferentes frações resultantes do processo de extração da proteína de <i>Tenebrio molitor</i> em duas condições de solubilização (20 °C e 50 °C).	55
Figura 19 - Índice de aceitação dos diferentes parâmetros avaliados nos biscoitos.	58
Figura 20 - Intenção de comprar os diferentes biscoitos	58
Figura 21 - Índice de aceitação dos diferentes parâmetros avaliados nas bolachas com 4% de larvas, 2%, 4% e 8% de proteína de <i>Tenebrio molitor</i> sem e com especiarias	59
Figura 22 - Índice de aceitação global por faixa etária nas bolachas com 4% de larvas, 2, 4 e 8% de proteína de <i>Tenebrio molitor</i> sem e com especiarias	59
Figura 23 - Intenção de compra das bolachas com 4% de larvas, 2, 4 e 8% de proteína de <i>Tenebrio molitor</i> e com especiarias juntamente com 8% de proteína de <i>Tenebrio molitor</i>	60
Figura 24 - Aspeto das salsichas preparadas com 50% da proteína de <i>Tenebrio molitor</i> obtida após solubilização a 20 °C e a 50 °C.	60
Figura 24 – Apresentação dos diferentes biscoitos e bolachas produzidas com larvas e diferentes % de proteína extraída de <i>Tenebrio molitor</i>	64

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Teores de cinza, proteína e fibra de <i>Tenebrio</i>	12
Tabela 2 - Teor de aminoácidos do <i>Tenebrio molitor</i> (mg/g proteína) e outras fontes de proteína animal	14
Tabela 3 - Teor de ácidos gordos do <i>Tenebrio molitor</i> e de outras fontes de proteína animais (g/100g de massa edível)	16
Tabela 4 – Binómio Temperatura/tempo para a determinação da cinza	19
Tabela 5 – Ensaio de solubilização realizados para a otimização do processo de extração da proteína de <i>Tenebrio molitor</i> .	27
Tabela 6 – Ordem de adição dos diferentes ingredientes para a produção de salsichas e tempos de homogeneização	32
Tabela 7 - Composição química e teor de contaminantes das larvas de <i>Tenebrio molitor</i> .	34
Tabela 8 - Perfil de ácidos gordos das larvas de <i>Tenebrio molitor</i> (n=6)	37
Tabela 9 - Perfil de aminoácidos obtido (n=6) para as larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	39
Tabela 10 – Valores obtidos para diferentes parâmetros microbiológicos (log ufc/g)	41
Tabela 11 – Percentagem de solubilização da proteína de <i>Tenebrio molitor</i> obtida em diferentes condições de solubilização (n=6 para cada condição)	43
Tabela 12 - Resultados obtidos (%proteína relativamente ao teor inicial) na precipitação das proteínas a diferentes pH (n=6 para cada condição)	45
Tabela 13 – Rendimento obtido para o processo de extração da proteína de <i>Tenebrio molitor</i> após solubilização a 20 °C com 30 min de agitação e a 50 °C com 2h de agitação (n=6)	46
Tabela 14 – Composição proximal, parâmetros da cor e propriedades funcionais da P20 e P50.	50
Tabela 15 – Propriedades funcionais de proteínas de diferentes fontes obtidas por vários autores	51
Tabela 16 - Teor de aminoácidos (g/100g proteína) das proteínas extraídas de <i>Tenebrio molitor</i> por solubilização a 20 °C e 50 °C (n=3).	53
Tabela 17 – Proteínas e respetivos pesos moleculares, identificadas por vários autores	56
Tabela 18 – Composição proximal das bolachas com 4% de larvas e com 2%, 4% e 8 % (m/m) de proteína extraída de <i>Tenebrio molitor</i> .	61
Tabela 19 – Parâmetros da cor das bolachas com 4% de larvas e com 2 %, 4 % e 8 % (m/m) de proteína extraída de <i>Tenebrio molitor</i>	62
Tabela 20 - Dimensões, dureza e fraturabilidade das bolachas (n=15) com 4% de larvas e com 2%, 4% e 8 % (m/m) de proteína extraída de <i>Tenebrio molitor</i>	63

ABREVIATURAS

% - percentagem

a.a. – amino ácidos

ALOA - Chromocult Listeria seletivo Agar

APT - Agua Peptonada Tamponada

BP - Baird Parker Agar com o suplemento egg yolk telurite

BSA – “Bovine serum albumin”

$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ – Nitrato de cádmio

CHCl_3 – Clorofórmio

CH_3COCl – Cloreto de acetilo

CHR - chromocult

CO_2 – Dióxido de Carbono

Da - Dalton

MeOH - Metanol

E. coli – *Escherichia coli*

EFSA - European Food Safety Authority

EN – Norma Europeia

FAME – “Fatty Acid Methyl Esters” ou ésteres metílicos

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations

FDA - Food and Drug Administration

FMOC – “9-fluorenylmethyl chloroformate”

g - Unidade de aceleração

GC – Cromatógrafo gasoso

h – Horas

Hz - hertz

H_2O – Água

H_2O_2 – Peróxido de hidrogénio

HCl – Ácido Clorídrico

Hg – Mercúrio

HNO_3 – Ácido nítrico

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

Hz - Hertz

INSA - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

kDa – kilo Dalton

m - Massa

Máx. – Máximo

MgCl_2 – Cloreto de Magnésio

Min. - Mínimo
min. – minutos
MRD – Maximun Recovery Diluente
N₂ – Azoto na forma gasosa
NaCl – Cloreto de sódio
NaOH – Hidróxido de sódio
NO_x – óxidos de azoto
NP - Norma Portuguesa
OPA – “ α - phthalaldehyde” ou orto ftaldeído
P20 – proteína extraída de *Tenebrio molitor* por solubilização a 20°C e precipitação a pH4.
P50 – proteína extraída de *Tenebrio molitor* por solubilização a 50°C e precipitação a pH4.
Pa – Pascal
PCA – Plate count agar
Pb(NO₃)₂ – Nitrato de chumbo
PCBs – Compostos Bifenilpoliclorados
pH - Potencial Hidrogeniónico
psi – “pound force per square inch” ou libra-força por polegada quadrada
s – Segundos
Rapid - RAPID' *Salmonella* Medium
RB - Dichloran-rose bengal chloramphenicol agar
S. aureus – *Staphylococcus aureus*
TFA – Ácido trifluoroacético
TBX - Tryptone Bile X-Glucuronidemedium
TSA - Triptona Soja Agar
ufc - Unidade Formadora de Colónias
UV-Vis - Ultravioleta-visível
VRBGA - violet red bile glucose agar
XLD - Xylose Lysine Desoxycholate
WHO - World Health Organization

1. INTRODUÇÃO

1.1. Alimento vs crescimento da população mundial

A população humana tem vindo a crescer a um ritmo exponencial e estima-se que até 2050, a população mundial irá atingir aos 9 biliões de pessoas (FAO/WUR, 2013). Com a globalização dos mercados e a disponibilização de informação via internet, houve um aumento das trocas comerciais e da disponibilização de diferentes alimentos nos vários cantos do mundo. Esta globalização levou a que países onde não era hábito o consumo de determinados produtos passassem a fazê-lo. Surgiu assim na Europa os hambúrgueres e o sushi, na América do Norte as *pizzas* e *pastas*, na China os bifes de vaca ("*steak*"), etc.

A mudança nos hábitos alimentares e o aumento do consumo de produtos de origem animal, acompanhado com o seu rápido crescimento, potenciou o desenvolvimento dos regimes intensivos de produção, tanto na pecuária como na aquacultura, para suprir as necessidades de procura de alimentos. No entanto, na produção destes animais é necessário o consumo de inúmeros recursos naturais (água, extensões de terra, farinhas de peixe e soja) e esta leva ao aparecimento de efeitos colaterais negativos como a emissão de metano para atmosfera, a poluição de solos e recursos hídricos, a desflorestação para formação de áreas de pastagens (FAO/WUR, 2013; Janson & Berggren, 2015). A ineficiência da produção (elevados consumos de recursos *versus* baixa taxa de conversão alimentar) juntamente com os efeitos negativos sob o meio ambiente leva a que comecem a surgir alertas da FAO para a necessidade de encontrar fontes alternativas de proteína para sustentar a população humana no futuro.

1.2. Entomofagia como alternativa

Uma das fontes alternativas de proteína animal que tem vindo a ser sugerida são os insetos tanto para a utilização em alimento composto para animais como para consumo humano.

O consumo de insetos é designado por entomofagia (Jansson & Berggren, 2015). A palavra "inseto" deriva da palavra em latim *insectum*, cujo significado é "cortado em secções". É uma classe pertencente ao reino Animal filo Artropoda, sub-filo Hexapoda, que apresenta como características um exosqueleto de quitina, o corpo dividido em três partes (cabeça, tórax e abdómen), com três pares de patas articuladas, olhos compostos e um par de antenas (Purves et al., 2003). São animais de sangue frio que se reproduzem rapidamente e com um elevado número de descendência, capazes de metamorfosear para melhor se adaptarem às condições ambientais, de tolerar pressões elevadas ou vácuo, bem como radiações (FAO/WUR, 2013 ¹ cita Delong, 1960).

Os insetos podem ser encontrados numa grande diversidade de habitats, apesar de nos oceanos existirem em menor número pelo facto de espécies do sub-filo Crustacea (outro

¹ Delong, D.M. (1960). Man in a world of insects. *The Ohio Journal of Science*, 60(4): 193–206.

subfilos dos artrópodes como por exemplo, os camarões, caranguejos, lagostas) dominarem o habitat (FAO/WUR, 2013).

Apesar do consumo de inseto ser culturalmente pouco aceite nos países ocidentais, são tradicionalmente consumidos nos países tropicais e subtropicais, e o seu consumo têm diversos benefícios (Resh & Cardé, 2003). Existem cerca de 1700 espécies de insetos que podem ser consumidas e pertencem maioritariamente à ordem Coleoptera, Hymenoptera, Orthoptera e Lepidoptera (Durst et al., 2010). Dependendo do tipo de metamorfose que a espécie de inseto tem, determina-se em que fase do ciclo é que ele poderá ser consumido. Em regra, insetos com metamorfoses complexas ou completas (da ordem Lepidoptera, Coleoptera e Hymenoptera) são consumidos maioritariamente no estado larvar e, ocasionalmente, no estado de pupa, ao passo que os com metamorfoses incompletas ou simples, (da ordem Orthoptera, Isoptera, Heteroptera e Homoptera), são consumidos na fase ninfa ou adulta (Resh & Cardé, 2003).

1.3. Porque é a Entomofagia uma alternativa para a alimentação humana e animal?

A Entomofagia é uma alternativa para a alimentação humana e animal porque a produção de insetos é uma alternativa sustentável, com custos baixos e apresenta uma série de vantagens, nomeadamente:

- Eficiente conversão alimentar (conversão de alimento em proteína), por serem animais de sangue frio (FAO/WUR, 2013, Brian Spang, 2013);
- Menor emissão de gases com efeito de estufa (CO_2 , CH_4 , NH_3 e NO_2) (FAO/WUR, 2013);
- Reprodução rápida, com elevado número de descendentes (FAO/WUR, 2013; Resh & Cardé, 2003; Spang, 2013);
- Conversão de resíduos orgânicos (subprodutos da indústria alimentar e do papel) em proteína de elevada qualidade (FAO/WUR, 2013);
- Menor consumo de água, alimento, energia e menor extensão de terra para a produção (FAO/WUR, 2013).

Diversos autores defendem que a produção de insetos tem um impacto negativo para o ambiente menor do que os restantes tipos de produção animal não só pelo facto de as emissões de gases com efeito de estufa, o chamado GHG (“greenhouse gas”), serem muito menores mas, também pela menor quantidade de terra (LU – “Land use”, expressa em m^2) e energia usada (EU – “Energy use”, expressa em MJ) no decurso da produção. Outro indicador muito usado para a avaliação do impacto ambiental é o chamado potencial efeito de estufa ou GWP (“Global warming potential”), expresso em kg equivalentes de CO_2 ($\text{CO}_2\text{-eq}$), e que corresponde à soma das emissões de CO_2 , CH_4 e NO_2 (Oonincx et al. 2010 e Guinee J., 2010).

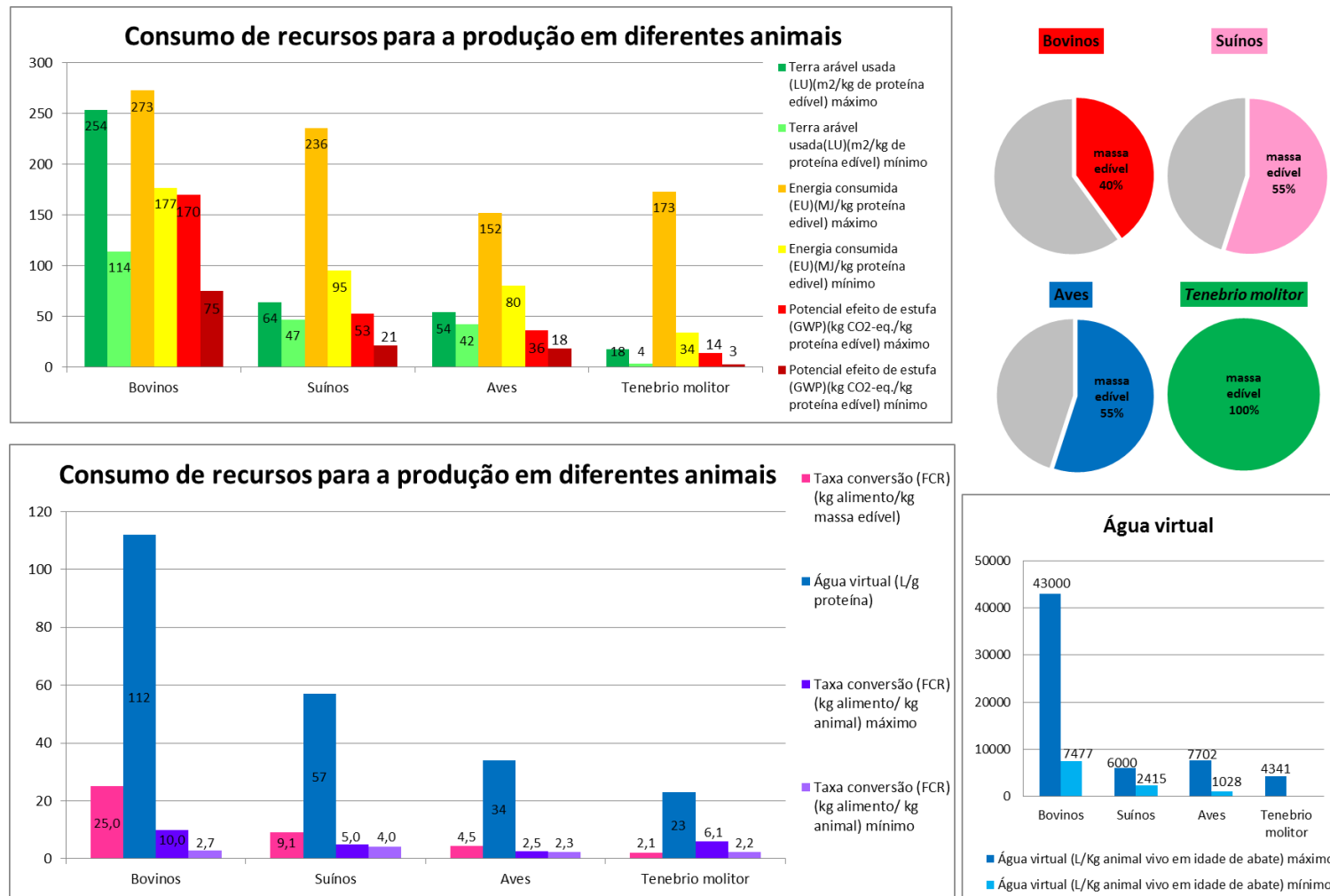
citado por Oonincx et al. 2012 ²⁾). É possível comprovar atendendo aos valores reportados por diversos autores, e que foram adaptados na Figura 1, que o GWP obtido na produção de *Tenebrio molitor* corresponde entre 4 a 8% do valor para a produção de bovinos, entre 14 a 26% do valor da produção de suínos e entre 17 a 39% do valor da produção de aves. No caso dos valores obtidos para o LU na produção de *Tenebrio molitor* corresponde 4 a 7% do valor para a produção de bovinos, 9 a 28% do valor da produção de suínos e 10 a 33% do valor da produção de aves. O único indicador menos discrepante é a energia necessária no decurso da produção uma vez que, de acordo com Oonincx et al. 2012, para o desenvolvimento do *Tenebrio molitor* é necessária uma temperatura específica e, dependendo da temperatura exterior, poderá haver um gasto de energia na manutenção dessa temperatura.

Outro indicador importante é o chamado “água virtual” (expressa em L/kg animal). Chapagains & Hoekstra (2003) definiram o conceito de “água virtual” em termos da produção como sendo a quantidade de água usada na produção de um produto, ou seja, corresponde ao somatório da quantidade de água existente no animal vivo (no alimento e água consumido, da quantidade de água gasta na limpeza do campo e do animal) e da quantidade de água gasta na produção (incluindo os produtos secundários). A produção de *Tenebrio molitor* é bastante económica, em termos de recursos hídricos (Figura 1). São necessários apenas 23 L/g de proteína ao contrário dos bovinos e suínos cujos valores são 112 L/g de proteína e 57 L/g de proteína, respetivamente.

Na produção animal existe um determinado ponto em que o animal atinge o máximo de crescimento e a partir do qual o fornecimento de alimento não terá impacto no seu desenvolvimento. A partir desse ponto todo o investimento feito (consumo de recursos) irá resultar em perdas de lucros (Spang, 2013). A taxa de conversão alimentar ou FCR (“Feed conversion rate”), definida como kg alimento/kg animal, é uma medida que indica a quantidade de alimento que é necessário fornecer para produzir um aumento de 1 kg na biomassa do animal e é utilizado como indicador do impacto ambiental e da viabilidade económica da produção (Spang, 2013; FAO/WUR, 2013). Quanto maior o valor de FCR menor é a eficiência da produção. Analisando a Figura 1, a diferença entre FCR obtido para a produção de aves e suínos relativamente à produção de *Tenebrio molitor* não é grande. No entanto, quando comparamos com o FCR obtido para a produção de bovinos, esta diferença torna-se mais notória. Quando convertemos os valores em kg alimento por kg de massa edível do animal, uma vez que existem partes dos animais que não são consumidas, estas diferenças acentuam-se mais (FCR para *Tenebrio molitor* corresponde a 47% do obtido para as aves, a 23% do valor obtido para os suínos e 85% do valor obtido para os bovinos). Isto significa que o *Tenebrio molitor* é 2 vezes mais eficiente em converter o alimento em “carne” que as aves, 4 vezes mais eficiente que os suínos e 12 vezes mais que os bovinos (FAO/WUR 2013)..

² Guinee J (2001) Handbook on life cycle assessment - Operational guide to the ISO standards. *International Journal of Life Cycle Assessment*, 6, 255–255.

Figura 1 - Produção de carne de bovino, suíno, ave e de *Tenebrio molitor*, em termos de consumo de recursos ambientais e comparando com a percentagem de massa edível obtida.



Adaptado de: Chapagain & Hoeskstra 2003; Pimentel et al. 2004; De Vries & Boer 2010; Wilkinson 2011; Oonix et al. 2012; Van Huis 2013; Van Broekhoven et al. 2015; Miglietta et al. 2015.

Atendendo a todos os índices apresentados e que a % de massa edível do *Tenebrio molitor* é quase 100% comparativamente com os bovinos (40%), suínos e aves (55%), consegue-se perceber quais as vantagens que este tipo de produção apresenta e, o porquê de existir um grande entusiasmo e promoção no impulsionamento da produção de insetos.

Para além das vantagens acima mencionadas, os benefícios do consumo de insetos são também vários. À semelhança de outros animais, o seu valor nutricional é dependente do estado de desenvolvimento, da espécie em questão, do habitat e da dieta, mas no geral:

- São fonte de proteína de alta qualidade e de aminoácidos essenciais (FAO/WUR, 2013; FAO, 2010; Ghaly & Alkoaik, 2009 e Verkerk et al., 2007 citado por Brian Spang, 2013³);
- São fonte de ácidos gordos (o teor de n3 e n6 nas larvas de *Tenebrio molitor* são comparáveis com o pescado) (FAO/WUR, 2013; FAO, 2010) (Bukkens, 1997, Banjo et al., 2006; Verkerk et al., 2007 citado por Brian Spang, 2013³);
- Fonte de fibra e minerais como cobre, ferro, cálcio, magnésio, manganês, fósforo, selénio e zinco (FAO/WUR, 2013; FAO, 2010);
- É expectável um menor risco no que se refere a zoonoses (doenças transmitidas de animais para humanos) (FAO/WUR, 2013).

Como fatores socioeconómicos (FAO/WUR, 2013), podemos referir as seguintes vantagens:

- Baixo investimento para a produção de inseto;
- Não são necessários grandes equipamentos ou tecnologia avançada;
- Possibilidade de criar pequenas zonas de produção a nível rural ou urbano.

1.4. Consumo de insetos

Os insetos já são consumidos por cerca de 2 biliões de pessoas em diversos países da África, Ásia e América do Sul. As espécies mais consumidas são besouros (Coleoptera) (31%), lagartas (Lepidoptera) (18%) e abelhas, vespas e formigas (Hymenoptera) (14%). São mais consumidos em países tropicais uma vez que o clima potencia o seu crescimento e tamanho, não têm necessidade de hibernar, existem em maior variedade e, pelo fato das populações terem conhecimento do local e altura para colheita das diferentes espécies. Estes fatores não invalidam que em países temperados, como a China, Japão e México, onde o consumo de algumas espécies se verifica, e onde se desenvolvem melhor do que em outros tipos de clima (FAO/WUR, 2013; Spang, 2013).

³ Verkerk, MC, Trammer, J, Van Trijp, JC, Martens, DE. (2007). Insect cells for human food. *Biotechnology Advances*, 25, 198-202; Bangkok, Thailand. Banjo, A.D., Lawal, O.A., Songonuga, E.A. (2006). The nutritional value of fourteen species of edible insects in southwestern Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 5, 298-301; Bukkens, SGF. (1997). The nutritional value of edible insects. *Ecology of Food and Nutrition*, 36 (Special Issue: Minilivestock), 287-319; Fast, PG. (1966). A comparative study of the phospholipids and fatty acids of some insects. *Lipids*, 1, 209-215.

O consumo de insetos é ainda menosprezado nas sociedades ocidentais devido a fatores culturais, nomeadamente por causarem alguma aversão e por serem vistos como uma “peste”(FAO/WUR, 2013). Adicionalmente, o facto do consumo de insetos não fazer parte dos hábitos de consumo dos países ocidentais poderá também estar relacionado com o seu contexto histórico-social e, com o fato de a Europa ter no passado um maior conhecimento da produção de animais de grande porte e consequentemente uma maior influência sobre os outros países. No entanto, devido à globalização das trocas a nível mundial, poder-se-á observar uma alteração rápida nos padrões de consumo, à semelhança do que se observou no caso do consumo de *sushi* nos países ocidentais (FAO/WUR, 2013; Rumpel & Schlüter, 2013).

De acordo com Rumpold et al. 2013, os insetos apresentam um grande potencial quando incorporados em produtos alimentares, pois as suas proteínas podem apresentar propriedades funcionais importantes como a capacidade de retenção de água, a capacidade de absorção de óleo e a capacidade emulsionante. Assim, podem ser usadas para aumentar o valor nutricional e/ou melhorar propriedades texturais e sensoriais de produtos alimentares.

A produção de insetos apresenta ainda outros benefícios para a natureza e para a sociedade, nomeadamente (FAO/WUR, 2013):

- Promoção da reprodução de plantas;
- A possibilidade de conversão de lixo orgânico;
- Controlo natural de pragas;
- Aumento da variabilidade de produtos para consumo Humano;
- Fornecimento de biomateriais (ex. Seda, quitosano para produção de polímeros biodegradáveis para embalagem de alimentos e como antioxidante e antimicrobiano).

1.5. Produção em massa de insetos

Há muito que os insetos são produzidos na natureza sem, no entanto existir um controlo e colheita programada. Este tipo de produção conduz à destruição das florestas, colheita excessiva e extinção de espécies (FAO, 2010; Rumpel & Schlüter, 2013).

De fato, é necessário que a produção de insetos em massa seja segura, controlada e automatizada para que seja competitiva face à produção de outras fontes de proteína. Fatores como o tamanho do inseto, a taxa de reprodução, o comportamento social, a taxa de sobrevivência, as características nutricionais, a taxa de produção de ovos e sua eclodibilidade, a duração de cada fase de desenvolvimento, a taxa de conversão alimentar, os custos associados à alimentação, a capacidade de crescimento em elevadas densidades populacionais e qualidade proteica, terão de ser tidos em conta na seleção das espécies a produzir. Por sua vez, fatores como a temperatura, iluminação, humidade, ventilação,

composição e quantidade de alimento fornecida, disponibilidade de água e contaminações microbiológicas, terão também de ser ajustados (FAO, 2010; Rumble & Schlüter, 2013).

Para maximizar a produção e reduzir os custos, será necessário o desenvolvimento de novas tecnologias que permitam (FAO, 2010; Rumble & Schlüter, 2013):

- Monitorizar a produção;
- Automatizar e controlar o fornecimento de alimento e a colheita dos insetos;
- Remover insetos mortos/infetados;
- Separar automaticamente a fração proteica da lipídica e da quitina para posterior embalamento e distribuição.

À semelhança de outros tipos de produção, será também necessário estabelecer procedimentos adequados de manuseamento, armazenamento e embalamento para minimizar contaminações microbiológicas e para garantir um nível elevado de segurança do produto (FAO, 2010; Rumble & Schlüter, 2013).

1.6. Riscos associados ao consumo de insetos

Os riscos relacionados ao consumo de insetos estão dependentes de vários fatores: espécie de inseto, condições de produção (meio ambiente e alimento fornecido), condições de conservação e tipo de processamento do produto (Superior Health Council, 2014). Existem várias espécies de insetos que não são comestíveis porque contêm enzimas que podem causar deficiências no organismo de quem os consome, ou porque os seus mecanismos de defesa formam substâncias químicas tóxicas. Além disso, as espécies que são produzidas em ambientes não controlados podem conter pesticidas, contaminantes químicos e microbiológicos (Rumpold et al. 2013).

1.6.1. Potencial alergénico

Alergia alimentar é definida como sendo uma resposta imunitária do organismo após exposição a um dado alimento e que pode causar reações adversas que vão desde urticária até mesmo à anafilaxia (Belluco et al. 2013). Apesar da existência de poucos estudos que relatem a existência de reações alérgicas associadas ao consumo de insetos, Belluco et al. (2013) relata reações alérgicas e anafilaxias relacionadas ao consumo de insetos, a como cochonilha, reações de anafilaxia e urticária e/ou angioedema após a ingestão de alimentos com o corante vermelho extraído da cochonilha, reações alérgicas devido à inalação/ingestão de lentilhas contendo *Bruchus lentis* e choque anafilático devido à ingestão de lagartas e pupa de bicho-da-seda (Belluco et al. 2013). Existe a possibilidade de pessoas com alergia à ingestão de marisco poderem também apresentar alergia ao consumo de insetos pela similaridade de algumas sequências na tropomiosina.

No entanto, de acordo com FAO/WUR (2013), a ingestão de insetos não apresenta um risco significativo na maioria da população.

1.6.2. Riscos microbiológicos

Os insetos são conhecidos por serem vetores de contaminação microbiológica. Os perigos microbiológicos estão associados à flora intrínseca do inseto ou a contaminações decorrentes no seu manuseio. Dada a diferença taxonómica entre insetos e humanos, é expectável que a flora intrínseca do inseto seja inofensiva para os humanos e que os perigos microbiológicos estejam correlacionados com as condições de manuseio, colheita, armazenagem e processamento dos insetos (EFSA, 2015).

A revisão bibliográfica de Belluco et al. (2013) menciona que num estudo, para as espécies *Zoophobas morio*, *Tenebrio molitor*, *Galleria mellonella* e *Acheta domesticus*, obtiveram-se contagens elevadas de bactérias Gram positivas (*Micrococcus* spp., *Lactobacillus* spp. e *Staphylococcus* spp.), coliformes totais e fecais (na ordem das 10^5 a 10^6 ufc/g) mas não foi detetada a presença de *Salmonella* spp. ou de *Listeria monocytogenes*. Estes autores referem também que, bactérias como *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella aerogene*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus tamarii*, *Bacillus cereus* e *subtilis* estão presentes na superfície de insetos frescos e no seu intestino. Estes autores também mencionam a presença de *Staphylococcus* spp. em insetos termicamente processados.

Segundo um relatório de opinião científica da EFSA (EFSA, 2015), foram detetados níveis elevados de contagens de bactérias aeróbias totais (na ordem da 10^7 ufc/g), bactérias aeróbias formadoras de esporos, de bactérias anaeróbias em espécies como o *Tenebrio molitor*, *Locusta migratória*, incluindo e *Zophobas atratus*. No entanto, não foi detetada a presença das bactérias patogénicas *Clostridium perfringens*, *Salmonella* e *Vibrio*. Aparentemente, não há crescimento de bactérias patogénicas, apesar destas poderem estar presentes nos substratos. Posto isto, logo, a prevalência de patogénicos nos insetos será inferior comparativamente com outros tipos de animais para consumo Humano. De acordo com o parecer do Superior Health Council (2014), a aplicação de um tratamento térmico permite uma redução de 2 a 3 log no teor de bactérias aeróbias totais e 3 a 5 log no teor de *Enterobacteriaceas*. No entanto, este tratamento não elimina os esporos que poderão estar presentes, tendo este risco de ser considerado na avaliação das condições de produção e processamento do produto. Rumpold et al. (2013) também reportou casos de botulismo e intoxicações alimentares devido à presença de aflotoxinas em insetos que foram consumidos.

Em relação a fungos patogénicos, alguns estudos mostram a presença de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* e *Rhizopus*, podendo alguns deles produzir micotoxinas extremamente prejudiciais para o consumidor. Para controlo dos fungos seria recomendável a utilização

de substratos secos e implementação de boas práticas de produção (Superior Health Council, 2014).

Relativamente a vírus, os que são patogénicos para os insetos não o são para os humanos mas, alguns vírus patogénicos para os vertebrados (ex. o arbovírus) podem hospedar-se nos insetos e ser transportados passivamente por estes, tornando-os vetores de contaminação para o consumidor (EFSA, 2015).

É possível também, a existência de parasitas, fungos e leveduras nos insetos prejudiciais para a saúde Humana mas, todos os riscos microbiológicos supracitados poderão ser minimizados recorrendo a medidas apropriadas no decurso do maneio, colheita e armazenagem, adoção de um processo automatizado na produção e utilização um processamento térmico ou físico adequado (Rumpold et al. 2013).

1.6.3. Riscos químicos

De acordo com Belluco et al. (2013) e EFSA (2015), não existem muitos relatos de casos de efeitos adversos provocados pela presença de substâncias químicas em insetos consumidos. No entanto, o risco seria maior em espécies selvagens uma vez que estas poderão entrar em contacto com pesticidas usados em plantações ou contaminantes existentes no meio ambiente e acumular no organismo por ingestão dos mesmos.

Substâncias tais como dioxinas, PCBs, metais pesados, resíduos de pesticidas, antibióticos ou fungicidas, são exemplos de vários perigos químicos que poderão estar no ambiente ou alimento e que poderão ser transferidos para os insetos (Superior Health Council, 2014). Por outro lado, existem espécies de insetos que são capazes de produzir substâncias tóxicas como um mecanismo de autodefesa e, se estas espécies ou se a fase em que desenvolvem a toxina não estiverem bem identificadas, poderão representar uma ameaça para a saúde humana. Por exemplo, o *Tenebrio molitor* produz quinonas, potencialmente cancerinogénicas e mutagénicas, apenas na fase adulta (Superior Health Council, 2014).

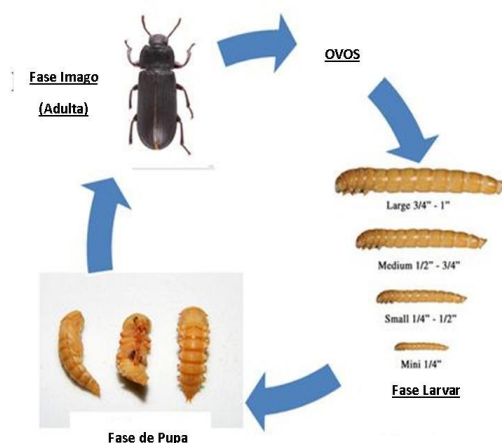
Esteróides, substâncias cianogénicas, tolueno, benzoquinonas, arsénio, chumbo foram alguns dos compostos identificados como estando presentes em algumas espécies de insetos. Mas, mais uma vez, boas práticas de produção, uma dieta e condições ambiente controladas permitem o controlo deste tipo de riscos (Belluco et al. 2013).

1.7. *Tenebrio molitor*

Inseto pertencente à família *Tenebrionidae* da ordem *Coleoptera* que se desenvolve preferencialmente nas regiões temperadas do hemisfério norte.

Apresenta um holometabolismo (metamorfose completa) dividido em 4 fases: fase embrião (ovos), a fase larvar, a fase de pupa e a fase imago (adulta) (Spang, 2013; Ghaly & Alkoik, 2009) (ver Figura 2).

Figura 2 - As quatro fases do ciclo de vida do *Tenebrio molitor*.



Adaptado de: Sugar glide free (2016)

De acordo com Morales et al. (2012), este inseto poderá representar uma importante fonte proteica para alimento composto para animais e consumo humano.

De acordo com Spang (2013), a temperatura ótima para o desenvolvimento do *Tenebrio molitor* está compreendida entre 25 – 27 °C, e a umidade relativa pode variar entre 30 a 70%. O seu substrato de desenvolvimento é constituído por farelo ou alimento composto para aves, cenouras, batatas e água (Superior Health Council, 2014). A duração de um ciclo de vida varia entre 280 – 630 dias, em função das condições de produção (Figura 2) (Hill, 2003⁴ citado por Spang, 2013). Cada fêmea deposita em média 400-500 ovos com 1,7-1,8 mm de comprimento e 0,6-0,7 mm de largura e o seu período de incubação é de 1 semana (27 °C) a 2 semanas (25 °C) (Ghaly & Alkoaik, 2009). A fase larvar tem a duração de 90 a 140 dias (Ghaly & Alkoaik, 2009). As larvas inicialmente apresentam uma cor branca e medem 0,2 cm de comprimento, podendo atingir nesta fase 1 g de peso e 3 cm de comprimento. Passam de seguida à fase de Pupa, onde a larva adquire uma coloração amarela e apresenta 1 cm de comprimento e que poderá durar de 6 (28 °C) a 18 dias (18 °C) (Ghaly & Alkoaik, 2009). Após 15 dias, atingem a fase adulta (besouros), adquirindo uma cor vermelha-acastanhada que gradualmente escurece até ficar preta. A fase adulta poderá durar entre 1 a 3 meses (Spang, 2013).

Diferentes fatores ambientais, tais como temperatura, umidade, *stress*, alimentação e a presença de patogénicos, podem influenciar o crescimento do *Tenebrio molitor*, estando, na maioria dos estudos indicado que a temperatura e a umidade relativa são os mais preponderantes (Spang, 2013).

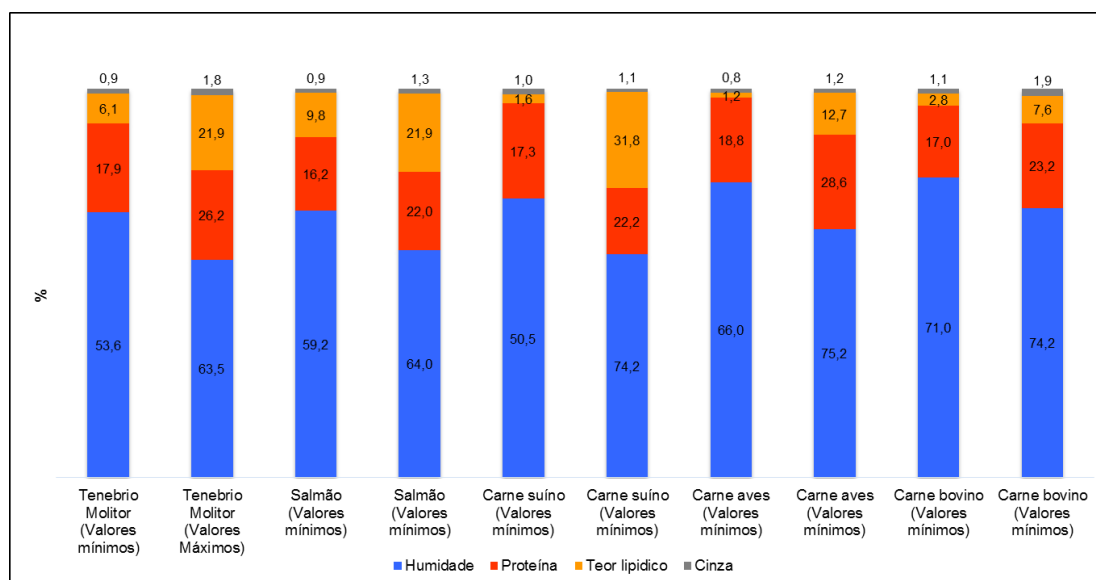
Uma vez que, o *Tenebrio molitor* é ingerido na fase larvar, após cerca de 8 a 10 semanas, as larvas são colhidas, peneiradas e colocadas sem alimento a uma temperatura entre 6 a 15 °C durante algum tempo para libertarem o conteúdo existente no intestino. Poderão depois ser congeladas com subsequente liofilização (Superior Health Council, 2014).

⁴ Hill, Dennis S. (2003). Pests: Class Insecta. *Pests of stored foodstuffs and their control*, 135-315.

1.7.1. Composição proximal

O *Tenebrio molitor* apresenta, em termos percentuais, um teor de proteína semelhante às restantes fontes de proteína animal (Figura 3). Além disso, é de salientar que o teor lipídico é muito semelhante ao do salmão.

Figura 3 - Composição proximal de *Tenebrio molitor* e de diferentes fontes de proteína animal



Adaptado de: Spang, 2013; Siemianowska et al. 2013; Mørkøre et al. 2001; Rumpold, 2013 (assumindo % humidade de 60%); Yi et al. 2013; Costa et al. 2015; Wiliam, 2007; INSA, 2016; Belluco et al. 2013.

Nota: Carne de suíno (Lombo, perna, Entrecosto e costela), Carne aves (frango e peru), Carne bovino (lombo, alcatra e acém de vaca e vitela). Os valores apresentados correspondem aos valores mínimos e máximos e cada coluna, não correspondem ao mesmo indivíduo/grupo.

Os teores de humidade do *Tenebrio molitor* são inferiores aos da carne de bovino e aves, mas na mesma gama que os de salmão. Nos teores de cinza, o *Tenebrio molitor* não apresenta grandes diferenças relativamente aos restantes animais.

1.7.2. Teores de quitina

O teor de fibra é variável nos insetos e é medido através da fibra bruta⁵ ou da fibra em detergente ácido ou FDA⁶ e fibra em detergente neutro ou FDN⁷ (Finke, 2007; Santos, 2013).

Fibra alimentar é definida como sendo “o remanescente de plantas comestíveis e substâncias associadas, polissacáridos e análogos de hidratos de carbono e lenhina, resistentes à digestão e à absorção no intestino delgado humano” (Gomes de Castro, 2003). As fibras podem ser solúveis em água como por exemplo, as hemiceluloses,

⁵ composto tipicamente por celulose e pequenas quantidades de hemicelulose e lenhina

⁶ composto por celulose, lenhina e quantidades variáveis de cinza e compostos azotados

⁷ composto tipicamente por celulose, hemicelulose e lenhina

pectinas e amido, ou insolúveis como é o caso da lenhina e da celulose. (Gomes de Castro, 2003)

Os constituintes da fibra dos insetos são ainda desconhecidos contudo, segundo Finke (2007), diversos autores sugerem que a fibra nos insetos é constituída por quitina⁸ dada a sua similaridade com a celulose⁹ e pelo facto de a fração de FDA conter azoto (Finke, 2007). Finke (2007) concluiu que o teor de fibra existente nos insetos deve-se às proteínas da cutícula e à quitina que se encontra numa matriz com as proteínas cuticulares, lípidos e outros componentes, formando um dos constituintes da exocutícula e endocutícula dos insetos (Finke, 2007).

Na Tabela 1, apresentam-se os teores de cinza, proteína e fibra do *Tenebrio* referidos por Finke (2007).

Tabela 1 - Teores de cinza, proteína e fibra de *Tenebrio*

Larvas de Tenebrio		
Cinza (mg/g)	10,0	
Proteína (mg/g)	174,0	
FDN (mg/g)	33,0	
FDA (mg/g)	23,0	
% Recuperação FDA (em termos de aminoácidos)	14,9	
% recuperação na fração FDA:	Larva	Adulto
Alanina	101	101
Arginina	100	101
Ácido Aspártico	101	101
Cistina	100	---
Ácido Glutâmico	101	101
Glicina	101	101
Histidina	101	100
Isoleucina	101	101
Leucina	101	101
Lisina	101	101
Metionina	100	---
Fenilalanina	101	101
Prolina	101	101
Serina	101	101
Trionina	101	101
Triptofano	100	---
Tirosina	101	101
Valina	101	102
Estimativa da Quitina (mg/kg em peso seco)	55,7	

Nota: Valores adaptados de: Finke (2007).

A análise de aminoácidos totais é um método mais exato para a determinação da % de proteína total do que a determinação do teor proteico com base no valor de azoto total e no fator de conversão (6,25) uma vez que, neste último a quitina existente é também contabilizada. No entanto, Finke (2007) concluiu que é razoável que, na maioria dos

⁸ polímero linear de várias unidades de $\beta \rightarrow (1-4)$ N-acetil-D-glucosamina

⁹ polímero linear de várias unidades de $\beta \rightarrow (1-4)$ D-glucopirranose

insetos, se assuma o teor de proteína bruta como sendo o teor proteico, dado o teor de quitina ser baixo e ao facto de quanto menor a quantidade de azoto na forma de quitina maior é a quantidade de azoto na forma de proteínas (Finke, 2007 e Spang, 2013).

Uma percentagem de recuperação elevada na análise de aminoácidos totais dá-nos a indicação que o valor de proteína bruta é próximo do teor de aminoácidos totais e, conseqüentemente, que o teor de azoto que provém da quitina será baixo. Se o teor de aminoácidos na fração de FDA for alto, significa que a estimativa do % azoto que provém da quitina é muito inferior à que provém das proteínas.

1.7.3. Perfil de aminoácidos

Os aminoácidos são as unidades estruturais das proteínas, sendo compostos orgânicos com um grupo amino e um grupo carboxílico. Apresentam uma variedade de funções importantes no organismo, tais como: regulação da expressão genética e função imunológica, síntese de proteínas, açúcares aaminados, glicoproteínas, participam na glucogénese e osmorregulação, são moléculas de sinalização de células, são precursores da síntese de hormonas e moléculas proteicas de baixo peso molecular, intervêm no transporte de cadeias longas de ácidos gordos para as mitocôndrias, etc. (Wu, 2009).

Existem 20 aminoácidos que são constituintes das proteínas no entanto, apenas 9 são considerados essenciais porque não podem ser sintetizados pelo organismo e por isso terão que ser fornecidos através da alimentação para supri as necessidades do organismo (Wu, 2009; Belitz et al., 2009). Os aminoácidos essenciais são: valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, triptofano, metionina, trionina, histidina e lisina (Belitz et al., 2009).

Na tabela seguinte, estão apresentados os valores máximos e mínimos dos diferentes aminoácidos, reportados por diferentes autores, para o *Tenebrio molitor* e outras fontes de proteína. Comparativamente com outras fontes, de uma forma genérica e tendo em conta apenas para os valores máximos, as larvas de *Tenebrio molitor* apresentam teores superiores de leucina, cisteína, treonina e alanina. Não obstante este fato, os valores de fenilalanina, tirosina, triptofano, glicina e ácido aspártico encontravam-se próximos dos valores para carne de bovino, suíno, de aves e para os produtos da pesca.

Os produtos da pesca são a proteína animal que apresenta teores mais elevados dos diferentes aminoácidos, tornando-os numa fonte de proteína de elevado valor nutricional.

Tabela 2 - Teor de aminoácidos do *Tenebrio molitor* (mg/g proteína) e outras fontes de proteína animal

	Larva <i>Tenebrio molitor</i>		<i>Tenebrio molitor</i> (Adulto)		Carne de bovino		Carne de galinha		Carne de suíno		Produtos da pesca	
	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.	Mín.	Máx.
Histidina (His)	15,3	37,9	17,1	28,7	10,7	40,6	7,8	23,4	---	21,6	16,7	43,2
Isoleucina (Ile)	21,4	50,3	39,2	43,5	15,8	43,0	10,6	16,2	---	57,4	50,6	88,9
Leucina (Leu)	34,1	106,4	51,7	82,7	23,2	82,1	17,4	22,2	---	85,2	55,6	126,3
Lisina (Lys)	26,7	64,9	22,3	44,3	25,8	90,7	19,7	84,4	86,5	98,9	84,0	142,1
Metionina (MET)	6,7	19,5	5,5	12,7	7,6	31,1	5,0	36,4	---	32,2	25,3	42,1
Cisteína (CYS)	5,2	10,9	5,9	6,8	9,4	10,1	8,2	8,8	---	9,9	7,4	10,4
MET+CYS	11,9	30,5	11,3	19,4	26,9	40,5	41,7	45,2	42,1	42,1	---	15,3
Fenilalanina (Phe)	16,1	43,7	15,4	26,2	13,0	49,2	6,6	46,1	13,0	39,5	38,9	63,2
Tirosina (TYR)	18,1	41,8	21,5	34,2	12,5	47,1	7,9	46,6	46,1	64,4	41,9	68,4
Phe+TYR	44,9	123,6	31,7	59,5	22,7	92,2	16,3	89,5	13,0	83,6	80,8	131,6
Treonina (THR)	28,8	79,9	16,4	33,3	9,7	43,0	9,3	43,4	---	44,1	35,4	55,4
Triptofano (Trp)	8,0	12,0	11,0	11,0	3,6	13,5	3,3	13,0	---	13,1	5,6	13,8
Valina (VAL)	24,4	69,0	33,7	63,3	15,1	46,0	11,5	15,4	---	60,9	56,2	84,2
Arginina (Arg)	24,3	60,3	26,3	43,0	19,5	69,1	14,8	70,8	66,2	75,0	61,8	110,5
Serina (SER)	20,9	54,6	22,0	41,4	13,9	54,3	8,2	55,4	45,7	57,8	39,3	73,7
Prolina (Pro)	30,2	74,1	34,3	63,3	11,6	50,0	3,4	12,1	---	50,2	35,4	105,3
Alanina (ALA)	36,9	82,4	47,9	76,4	17,9	66,8	12,6	15,6	---	58,4	50,0	100,0
Glicina (GLY)	24,1	59,8	54,4	84,4	13,5	63,1	10,4	19,7	---	57,1	33,3	115,8
Ácido Glutâmico (GLU)	56,8	132,8	52,4	89,0	27,9	165,9	14,8	37,7	---	144,9	156,6	242,1
Ácido Aspártico (ASP)	35,9	80,0	35,9	39,5	17,0	89,1	9,9	23,9	---	101,3	105,6	163,2

Fonte: Beach et al. 1943; Bandarra et al. 2004; Okrouhla et al, 2006; Straková et al, 2006; Ravzanaadii et al, 2012; Rumble & Schlüter, 2013; Yi et al, 2013; Zielińska et al, 2015; Jin et al, 2016.

Nota: Pescado inclui tanto as espécies magras, como as semi-gordas e gordas.

1.7.4. Perfil de ácidos gordos

À semelhança do que acontece para os aminoácidos, existem alguns ácidos gordos que não podem ser sintetizados pelo corpo humano ou a percentagem de síntese é muito baixa, e, por conseguinte, terão de ser introduzidos através de uma dieta específica (Chow, 2008).

O ácido α -linolénico (18:3n3 ou ALA) e o ácido γ -linoleico (18:2n6), não podem ser sintetizados por vertebrados, mas são metabolizados pelo organismo e através de sucessivas desnaturações e elongações por ação enzimática, podem ser convertidos, respetivamente, em ácido eicosapentaenóico (EPA ou 20:5n3) ou docosapentaenóico (DHA ou 22:6n3) e em ácido araquidónico (20:4n6 ou ARA). No entanto, dado a baixa percentagem de síntese destes ácidos gordos e devido ao papel preponderante que desempenham no organismo, é necessária a sua suplementação através da dieta. Os ácidos gordos EPA, DHA e ARA são posteriormente convertidos em diferentes eicosanóides (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, resolvinas, etc) que apresentam diferentes ações fisiológicas no organismo, como regulação das funções cardiovasculares, sistema reprodutor, respiratório, imunológico, etc. (Chow, 2008). Contudo, existem alguns organismos que conseguem sintetizar estes ácidos gordos numa maior extensão como por exemplo as algas marinhas e algumas sementes e outros, como por exemplo os peixes, que devido às suas características metabólicas, dieta e condições ambientais em que vivem, apresentam teores elevados destes ácidos gordos (Calder & Yaqoob, 2009).

Existem diversos benefícios para a saúde Humana associados ao consumo de ácidos gordos n3 PUFAs, nomeadamente, a diminuição da concentração de triacilglicerídeos no plasma, da pressão arterial, da ocorrência de arritmias e trombooses, levando à diminuição das doenças cardiovasculares; diminuição das doenças inflamatórias como artrites, asma, fibrose cística, etc.; melhoria do sistema imunitário e da sensibilidade à insulina e otimização dos sinais visuais e dos processos cognitivos e de aprendizagem, entre outros. Em termos de recomendações de consumo aconselha-se o consumo de 0,2 a 0,65 g/dia para a manutenção da saúde no geral, 1 g/dia para a prevenção secundária de enfartes do miocárdio e entre 2 a 4 g/dia para a redução dos triglicéridos no sangue (Calder & Yaqoob, 2009).

Os ácidos gordos também desempenham um papel importante em alguns dos atributos de qualidade da carne, como por exemplo, a sua firmeza, cor, sabor e aroma (Chow, 2008). Nas tabelas seguintes, estão apresentados os valores obtidos por diferentes autores dos ácidos gordos do *Tenebrio molitor*, e os das carnes de animais para consumo humano.

Tabela 3 - Teor de ácidos gordos do *Tenebrio molitor* e de outras fontes de proteína animais

		<i>Tenebrio molitor</i>	Bovino	Frango sem pele	Suíno	Corvina aquacultura	Salmão aquacultura
Valores em g/100g de massa edível	14:0	0,20	0,10	0,02	0,01	0,03	0,64
	15:0	---	0,01	---	---	0,01	0,07
	16:0	1,37	0,61	0,34	0,25	0,21	1,93
	17:0	---	0,03	0,01	---	0,00	---
	18:0	0,26	0,36	0,12	0,13	0,06	0,43
	SFAs	1,98	1,15	0,50	0,40	0,33	3,17
	14:1	---	0,03	---	---	0,00	---
	16:1	0,16	0,08	---	0,03	0,05	0,66
	18:1	3,03	1,10	0,62	0,39	0,18*	6,39
	20:1	---	0,02	0,01	0,01	0,04	1,08
	MUFAs	3,20	1,21	0,70	0,43	0,35	8,98
	18:2n6	2,79	0,20	0,21	0,12	0,11	1,92
	18:3n3	0,11	0,05	0,01	0,01	0,01	0,78
	20:3n6	---	0,02	0,01	---	0,00	---
	20:4n6	---	0,08	0,03	0,02	0,01	0,05
	20:5n3 (EPA)	---	0,03	0,01	---	0,05	0,66
	22:5n3 (DPA)	---	0,05	0,01	0,01	0,02	0,32
	22:6n3 (DHA)	---	0,01	0,01	---	0,16	1,15
	PUFAs	2,90	0,45	0,30	0,20	0,42	5,82
	Total n-3	0,11	0,14	0,03	0,02	0,27	3,50
	Total n-6	2,79	0,30	0,26	0,15	0,14	2,20
	Total ácidos gordos	8,08	2,80	1,50	1,03	0,70	11,37
Valores em % (b)	14:0	2,5	3,4	1,3	1,0	2,9	6,0
	15:0	---	0,4	---	---	---	0,6
	16:0	17,0	21,7	22,7	24,3	25,7	19,1
	17:0	---	1,0	0,7	---	---	0,4
	18:0	3,2	12,7	8,0	12,6	7,1	3,1
	SFAs	24,5	41,0	33,3	38,8	42,9	29,2
	14:1	---	0,9	---	---	---	---
	16:1	2,0	2,9	---	2,9	8,6	5,2
	18:1	37,5	39,4	41,3	37,9	15,7	19,3
	20:1	---	0,5	0,7	1,0	1,4	11,8
	MUFAs	39,7	43,0	46,7	41,7	28,6	47,4
	18:2n6	34,5	7,3	14,0	11,7	1,4	2,2
	18:3n3	1,3	1,7	0,7	1,0	---	1,1
	20:3n6	---	0,7	0,5	---	---	---
	20:4n6	---	2,7	2,0	1,8	5,7	0,4
	20:5n3 (EPA)	---	1,1	0,3	---	6,9	8,0
	22:5n3 (DPA)	---	1,8	0,6	0,6	3,0	1,7
	22:6n3 (DHA)	---	0,2	0,6	---	15,9	9,8
	PUFAs	35,9	16,0	20,0	19,4	28,6	23,4
	Total n-3	1,3	4,9	2,2	1,9	25,7	20,7
	Total n-6	34,5	10,7	17,2	14,4	7,1	2,2
	Razão n-6/n-3 (a)		25,81	2,21	7,82	7,40	0,52

Fonte: Belforti et al. 2015 assumindo uma %humidade de 60% , Williams, 2007; Costa et al. 2015; Costa et al. 2013. SFAs – Total de saturados; MUFAs – Total de monoinsaturados; PUFAs – total de polinsaturados. Os resultados dos suínos contempla apenas a parte magra.

(*) Valor correspondente apenas ao 18:1n9. (a) valor adimensional. (b) valores calculados a partir do valor em mg/100g de cada ácido gordo e do total de ácidos gordos.

O *Tenebrio molitor* apresenta um elevado teor de ácido oleico (Tabela 3) conhecido por ser responsável pela diminuição da pressão e dos níveis de colesterol no sangue nos humanos. No entanto, o elevado teor de saturados relativamente aos polinsaturados impõem que seja necessária uma otimização da dieta fornecida a este inseto com vista ao incremento dos níveis de PUFA's.

Comparando os teores dos diferentes ácidos gordos obtidos para as diferentes fontes de proteína animal (Tabela 3), observa-se que o *Tenebrio molitor* apresenta valores mais próximos do salmão (considerado como o exemplar em termos de perfil de ácidos gordos). À semelhança do salmão, a proporção de MUFA's nas larvas de *Tenebrio molitor* é superior aos PUFA's e SFA's mas na carne de bovino, frango sem pele e suíno, contrariamente, a proporção de ácidos gordos saturados é superior à dos polinsaturados. O *Tenebrio molitor* apresenta níveis muito elevados de linoleico e por conseguinte a razão n-6/n-3 é muito superior comparativamente com o observado noutras fontes de proteína animal. No entanto esta questão, como já foi referido, poderá ser ultrapassada com um ajuste na dieta fornecida.

2. Objectivos

Os objetivos deste trabalho foram os seguintes:

- Determinar as características nutricionais do *Tenebrio molitor* e os níveis dos principais contaminantes (químico e microbiológicos);
- Otimizar o método de extração das proteínas do *Tenebrio molitor* e caracterizar as propriedades funcionais dessas proteínas;
- Por fim pretendia-se criar um produto alimentar usando apenas a proteína extraída do *Tenebrio Molitor*.

3. MATERIAL E METODOLOGIAS

3.1 Larvas de *Tenebrio molitor*

As larvas de *Tenebrio molitor* foram fornecidas pela empresa Ingredient Odyssey, Lda, com sede em Lisboa.

A produção foi efetuada com uma humidade relativa entre 50% a 65%, temperatura entre 23 °C a 27 °C e em caixas (E2-0, Engels) com dimensões de 600x400x200 mm. Foi-lhes fornecido um alimento à base de farelo de trigo, suplementado com cenoura como fonte de água (condições referenciadas por Oonicx & Boer, 2012).

A colheita ocorreu após o aparecimento das primeiras pupas, sendo efetuada uma peneiração para separação das larvas de maiores dimensões, com as quais foi realizado este estudo.

As larvas foram transportadas até às instalações do IPMA em sacos à temperatura ambiente, sendo depois acondicionadas a 5 °C, dentro de caixas. Antes da sua utilização, as larvas foram peneiradas, lavadas com água corrente para remoção do farelo e moídas com uma grindomix da Retsch GM200. Uma porção dessas larvas foi liofilizada para a realização de algumas determinações como o perfil de ácidos gordos e de aminoácidos, teor de contaminantes e eletroforese.

3.2 Composição proximal

Todas as análises a seguir mencionadas foram efetuadas, pelo menos, em triplicado.

3.2.1 Determinação do teor de humidade (NP 2282, 2009) - Pesou-se 10 g de amostra para uma placa de vidro, previamente pesada numa balança de precisão 0,001 g, e colocou-se numa estufa a 105 °C ± 2 °C durante uma noite. Após este período, a placa foi colocada num exsiccador a arrefecer durante 1 h e posteriormente pesada. Para determinação da % humidade utilizou-se a seguinte equação:

$$\% \text{Humidade} = 100 - \left[\frac{m(\text{caixa petri} + \text{amostra seca}) (\text{g}) - m_{\text{caixa de petri}} (\text{g})}{m_{\text{amostra}} (\text{g})} \right] * 100$$

3.2.2 Determinação do teor de cinza (NP 2032, 2009) - Pesou-se 5 g de amostra para um cadinho, previamente pesado numa balança de precisão 0,001 g, e colocou-se numa estufa a 100 °C durante uma noite. Após este período, colocou-se o cadinho numa mufla a 200 °C durante 1 h e, de seguida prosseguiu-se o aquecimento com uma série de binómio temperatura/tempo, conforme indicado na tabela seguinte.

Tabela 4 – Binómio Temperatura/tempo para a determinação da cinza

T(°C)	250	300	350	400	450	500
Tempo(min)	30	60	60	30	30	1 noite

Após a calcinação da amostra, colocou-se o cadinho num exsiccador a arrefecer durante 1 h e posteriormente procedeu-se à pesagem da amostra. De seguida voltou-

se a colocar o cadinho na mufla a 500 °C durante 30 min. Repetiu-se o procedimento até pesagem constante ou a diferença entre duas pesagens seguidas não diferir mais de 1 mg. A %cinza das amostras foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{Cinza} = \frac{m_{(\text{cadinho} + \text{cinza})} (\text{g}) - m_{\text{cadinho}} (\text{g})}{m_{\text{amostra}} (\text{g})} * 100$$

3.2.3 Determinação do teor de gordura

Nas bolachas o teor de gordura foi determinado utilizando um procedimento interno do IPMA (baseado na metodologia descrita por Folch et al. (1956)). A 100 mg de amostra liofilizada adicionou-se 3 ml de uma solução de Clorofórmio:Metanol (CHCl_3 :MeOH) (2:1) e após agitação num vortéx a baixa rotação, colocou-se numa placa de agitação a 300 rpm durante 10 min. De seguida adicionou-se 3 ml HCl 0,1 N e 300 μl MgCl_2 0,5 % e agitou-se os tubos num vortéx a baixa rotação. Após a separação de fases por centrifugação a 2000xg durante 5 min, recolheu-se a fase orgânica para um tubo, previamente pesado. Adicionou-se novamente 3 ml da solução de CHCl_3 :MeOH (2:1), colocou-se numa placa de agitação a 300 rpm, 10 min à temperatura ambiente. Após centrifugação a 2000xg durante 5 min, recolheu-se a fase orgânica, procedeu-se à evaporação do solvente com azoto e pesou-se o resíduo para a determinação da massa de gordura obtida.

Nas larvas, o teor de gordura foi determinado com base no método de Bligh & Dyer (1959) com modificações. A 2 g de amostra adicionou-se 6 ml de CHCl_3 :MeOH (1:2) e homogeneizou-se num homogenizador (Polytron PT 3100D) durante 1 min. De seguida adicionou-se 0,8 ml de solução saturada de NaCl e, homogeneizou-se durante 30 s. Após a adição de 2 ml de CHCl_3 e 1 ml de água, com uma homogeneização no vortéx por 30 s entre cada adição, centrifugou-se a 5000 rpm, 3 min a 4 °C. Recolheu-se a fase orgânica para tubo, previamente pesado, e procedeu-se a uma segunda extração com 2 ml de CHCl_3 e 2 ml da solução saturada de NaCl. Agitou-se a mistura num vortéx por 30 s. Centrifugou-se a 5000 rpm, 3 min a 4 °C e recolheu-se a fase orgânica, para o tubo usado anteriormente. Após evaporação do solvente, procedeu-se à determinação da massa de gordura obtida.

Em ambos os casos, o teor de gordura ou lípidos totais foi calculado usando a seguinte equação:

$$\% \text{Gordura} = \frac{m_{(\text{Tubo} + \text{gordura})} (\text{g}) - m_{\text{Tubo}} (\text{g})}{m_{\text{amostra}} (\text{g})} * 100$$

3.2.4 Determinação do teor de proteína

A proteína total das amostras foi determinada num analisador de azoto FP-528 DSP da Leco (LECO, USA), calibrado com EDTA (Azoto – 9.57 ± 0.03) de acordo com o

método de Dumas (Saint-Denis & Goupy, 2004). A amostra é pesada numa cápsula/papel de estanho (cerca de 100 mg para amostra liofilizada ou 500 mg para amostra líquida), os gases resultantes do processo de combustão (CO₂, H₂O, NO_x e N₂) das amostras são homogeneizados no “ballast” e posteriormente é recolhida uma alíquota de 3 cm³. A alíquota passa por 3 filtros: o primeiro, de cobre, onde ocorre a redução do NO_x a N₂; o segundo, para remoção do CO₂ e, por fim, um último para a remoção da H₂O. O N₂ é então arrastado pelo Hélio para uma célula de condutividade onde a sua concentração é determinada (apresentada no software em % proteína). A proteína solúvel, foi determinada em triplicado com kit de determinação de proteína da Bio-rad, um método colorimétrico baseado no método de Bradford (1976). Este método utiliza o corante “Coomassie brilliant blue” G-250 que, quando se liga às proteínas forma um complexo, cuja absorvância tem um pico a 595nm. Adicionou-se 100 µl de diferentes concentrações de BSA e das diferentes amostras, a 5 ml do corante. Agitou-se num vórtex e após 5 min (tempo para a reação) determinou-se o valor de absorvância num espectrofotómetro UV-Vis Heyios da Unicam (Unicam, PORTUGAL). A quantificação das amostras fez-se pela curva de calibração efetuada com diferentes concentrações de BSA (1,36; 1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 mg/ml).

3.2.5 Determinação do teor de quitina (Gamage & Shahidi, 2007) – Adicionou-se 5 g da amostra num Erlenmyer com 100 ml de NaOH a 4% e aqueceu-se a 63 °C durante 3 horas. Filtrou-se a mistura obtida a vácuo, por um funil de Büchner e filtro Wattman n.º 1 e, de seguida, fizeram-se sucessivas lavagens da amostra desproteïnizada com água purificada até pH neutro. Por fim, lavou-se o resíduo com 75ml de acetona e colocou-se uma estufa a 100 °C durante a noite. Após pesagem do filtro com o resíduo desproteïnizado, adicionou-se num copo o resíduo seco, 10 ml de HCl e agitou-se durante 2 h. Filtrou-se novamente a vácuo, e, voltou-se a neutralizar o pH com sucessivas lavagens com água purificada, tendo-se adicionado 75 ml de acetona no final. Colocou-se o filtro mais o resíduo de quitina numa estufa a 100 °C durante a noite. Após arrefecimento em exsiccador, procedeu-se à pesagem do resíduo de quitina. A %quitina foi determinada de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{Quitina} = \frac{m(\text{resíduo de quitina}) \text{ (g)} * m(\text{Resíduo após desproteïnização}) \text{ (g)}}{m(\text{resíduo desproteïnizado pesada para o copo}) \text{ (g)} * m_{\text{amostra inicial}} \text{ (g)}} * 100$$

3.3 Perfil de ácidos gordos

O perfil de ácidos gordos foram determinado num cromatógrafo gasoso da Varian Star 3800 Cp (Varian, USA) com detetor de ionização de chama (FID) a 250 °C, após transesterificação em ésteres metílicos por catálise ácida (método de Lepage & Roy, 1986 modificado por Cohen

et al., 1988). Para a catálise ácida adicionou-se 5 ml de uma solução de cloreto de acetilo:metanol (1:19) a um tubo com cerca de 300 mg de larvas liofilizadas e um volume pré-determinado de padrão interno (21:0). Agitou-se o tubo num agitador vortéx 1 min e promoveu-se a reação de catálise após aquecimento num banho de água a 80 °C durante 1 h. Removeu-se os tubos do banho, deixou-se arrefecer e adicionou-se 1 ml de água purificada e 2 ml de heptano. Após 1 min de agitação no vortéx e centrifugação a 2000xg, 5min, recolheu-se a fase orgânica para um vial, que foi filtrada por uma coluna com sulfato de sódio anidro. Injetou-se, 2 µl da amostra no GC onde a coluna (DB-wax da Agilent) é aquecida a 180 °C, aumentando cerca de 4 °C/min, até atingir 220°C. O hélio é utilizado como gás de arraste e o tempo de duração da análise é de 40 min. Os vários picos foram identificados por comparação dos tempos de retenção com os padrões PUFA- 3 (óleo de savelha) e PUFA-1 (Fonte Marinha) da Sigma-Aldrich.

A determinação de teor de cada ácido gordo foi efetuada em triplicado e de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Teor (mg/100g)} = \frac{\text{Área do pico} * \text{Concentração PI (mg/ml)} * \text{Volume PI (ml)} * (100\text{-}\%H)}{\text{Área (PI)} * m_{\text{amostra}} \text{ (g)}}$$

3.4 Determinação da classe de lípidos

As classes de lípidos das larvas de *Tenebrio molitor* foram determinadas a partir da gordura extraída de *Tenebrio molitor*. A amostra foi diluída em CHCl₃ a uma concentração de 10 mg/ml. Aplicou-se 10 µl desta solução, em triplicado, numa placa de sílica gel G de 0,25 mm. Colocou-se numa tina e procedeu-se à sua eluição com uma mistura de hexano:éter dietílico:ácido acético (50:50:2). Após derivatização da placa com uma solução de ácido fosfomolibdico a 10% em etanol e ativação numa estufa a 110 °C, procedeu-se à determinação da % relativa de cada classe com recurso a um densitómetro (GS-800 densitometer) e ao software Quantity One 1-D Analysis da Bio-Rad (versão 4.5.2, Hercules, CA, USA). Para identificação de cada classe de lípido utilizou-se padrões de TAG (trioleato de glicerol), ácido oleico, colesterol, DAG (1,3 – dioleato de glicerol), MAG (1-monoleato – rac de glicerol) e fosfatidilcolina, todos da Sigma-Aldrich.

3.5 Perfil de aminoácidos

A determinação do perfil de aminoácidos executou-se em 3 etapas.

A primeira foi uma hidrólise ácida (AOAC, 1998 a, b) onde se pesou uma quantidade de amostra (em triplicado) com 1,5 a 2,0 mg de azoto para um tubo. Adicionou-se 3 ml de HCl 6 M com 0,1 % de fenol e 250 µl de padrão interno (solução de Norvalina e Sarcosina 10 nmol/µl). Depois criou-se uma atmosfera inerte no tubo por injeção de azoto, inseriu-se o tubo

num exsiccador contendo lentilhas de NaOH e colocou-se amostras sob vácuo. O exsiccador foi colocado dentro de uma estufa a 110-115 °C durante 24 h. Após arrefecimento, filtrou-se a amostra por um filtro Wattman nº1 para uma proveta, adicionou-se 6 ml de NaOH 6 M e perfez-se o volume a 20 ml com H₂O. A amostra foi depois filtrada para um vial, com uma seringa acoplada a um filtro de 0,45 µm. Conservou-se a -80 °C até injeção no HPLC (Agilent 1100 HPLC, Agilent, Palo Alto, CA). A segunda etapa consistiu na reação dos aminoácidos primários com o OPA e dos secundários com o FMOC por derivatização na pré-coluna. A terceira etapa consistiu na separação dos compostos por HPLC usando as condições descritas por Henderson et al. (2000) e detecção por UV (λ = 338 e 262 nm) e por fluorescência (λ =340/450 e 266/305). A identificação dos picos dos diferentes aminoácidos foi efetuada com base na curva de calibração efetuada para cada aminoácido e usando o software Agilent ChemStation para LC (Agilent, USA).

3.6 Determinação da concentração de contaminantes químicos

O cádmio (Cd) e chumbo (Pb) foram determinados de acordo com o descrito na EN 14084 (CEN, 2003) por espectroscopia de absorção atômica por forno atômico de grafite, recorrendo a um Varian apparatus SpectrAA 220Z (Varian, USA) com correção de Zeeman (k = 283,3 e 228,8 nm para Pb e Cd, respetivamente). A calibração foi realizada recorrendo ao padrão de Pb(NO₃)₂ e Cd(NO₃)₂ (1 g/L em HNO₃ 0,5 M). A amostra (0,5 g) foi pesada, em triplicado, para um vaso de digestão onde se adicionou 4 ml de HNO₃ e 1 ml de H₂O₂. A digestão ocorreu num digestor (Mars5 da CEM, North Caroline, USA) a uma pressão de 350 psi e potência de 1200 W, a 210 °C durante 15 min. Após arrefecimento, a amostra foi transferida para balão volumétrico de 25 ml e perfez-se o volume com água purificada. De seguida procedeu-se à diluição das amostras e determinação, no equipamento, da concentração de cádmio e chumbo. A concentração de mercúrio (Hg) foi determinada usando um espectrofotómetro (AMA 254, Leco, USA) (EPA,1998) e usando uma calibração linear com uma solução padrão de 1 g/L de Hg diluída em 0,5 M de HNO₃. A amostra (10 a 20 mg) foi colocada numa barquinha, previamente descontaminada, com um pouco de óxido de alumínio.

3.7 Caracterização microbiológica

Foi efetuada uma avaliação da carga microbiana das larvas de *Tenebrio molitor*, com base nos perigos microbiológicos referidos por Klunder et al. (2012), Ravzanaadii et al. (2012), Rumpold et al. (2013), Belluco et al. (2013) e EFSA (2015). Todas as operações foram realizadas em condições de assepsia, de acordo com a norma ISO 7218 (2007/Amd 1: 2013). Os meios de cultura, pertencentes à OXOID LTD (Basingstone, Hampshire, UK), exceto quando abaixo indicado, foram preparados de acordo com a norma ISO 11133 (2014). A amostra, solução-mãe e diluições decimais foram preparadas segundo a ISO 6887-3 (2003).

Preparou-se a solução-mãe com 25 g de larvas em 225 ml de Maximum Recovery Diluent (MRD) para os organismos não-patogénicos (diluição 10^{-1}). Para as determinações de *Salmonella* e *Listeria* pesou-se 25 g de larvas em 225 ml dos respetivos meios de pré-enriquecimento. As soluções foram homogeneizadas no aparelho Stomacher® 400 Circulator (Seward Lda, West Sussex, UK) durante 1 min. Para todas determinações, à exceção da contagem de bolores e leveduras, as placas inoculadas foram incubadas invertidas.

3.7.1 Contagem de bactérias aeróbias mesófilas totais (ISO 4833-1, 2013) – Inoculou-se 1 ml da solução-mãe e das diluições decimais sucessivas por incorporação em Plate Count Agar (PCA). As placas inoculadas, após solidificação, foram incubadas a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 dias. Após o período de incubação foram selecionadas as placas contáveis, ou seja, aquelas que continham menos de 300 colónias e procedeu-se à contagem do número total de colónias.

3.7.2 Contagem de bactérias aeróbias e anaeróbias mesófilas formadoras de esporos - Distribuíram-se 10 ml da solução-mãe e das diluições decimais sucessivas em tubos de ensaio. Estas alíquotas receberam choque térmico sub letal de ativação num banho de água a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 min, seguido de arrefecimento em água fria, até atingirem a temperatura ambiente. Inoculou-se por incorporação 1 ml da solução-mãe e das diluições decimais sucessivas em PCA. Para a contagem das bactérias anaeróbias colocaram-se as placas numa jarra de anaerobiose. A incubação das aeróbias e anaeróbias foi feita a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 h e depois procedeu-se à contagem do número total de colónias.

3.7.3 Contagem de bolores e leveduras (ISO 21527-1, 2008) – A sementeira foi realizada em meio Rose Bengal (RB). Inocularam-se, por espalhamento à superfície, duas alíquotas de, 0,5 ml da solução-mãe e 0,1 ml da solução-mãe e diluições decimais seguintes. Incubaram-se as placas a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 5 dias e depois procedeu-se à contagem total de bolores e leveduras.

3.7.4 Contagem de bactérias da família *Enterobacteriaceae* (ISO 21528-2, 2004) - Inoculou-se 1 ml da solução-mãe e das várias diluições por incorporação por dupla camada em Violet Red Bile Glucose Aga (VRBGA). Incubaram-se a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$, e depois procedeu-se à contagem das colónias características. Selecionou-se até 5 colónias características para isolamento por riscado em placas com Tryptone Soya Agar (TSA). Estas placas incubaram nas condições referidas anteriormente. Para confirmação das colónias presuntivas, foi feita a avaliação quanto à coloração Gram, produção de oxidase e à fermentação da glucose.

3.7.5 Contagem de coliformes e *Escherichia coli* (ISO 16649-2, 2001, adaptada) -

Inoculou-se 1 ml da solução-mãe e das várias diluições por incorporação em placas de meio Agar ChromoCult (CHR), da Merck KGaA, Darmstadt, Germany, e paralelamente de meio Tryptone Bile X-Glucuronide (TBX). Incubaram-se as placas de CHR a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durante 24 h e as de TBX a $44\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durante 18 a 24 h. De seguida, procedeu-se à contagem das colónias características.

3.7.6 Pesquisa e contagem *Listeria monocytogenes* (ISO 11290-1, 1996 e 11290-2,

1998/ Amd.1, 2004) – Para a pesquisa, após incubação da solução-mãe em ½ Fraser a $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durante $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$, inoculou-se por esgotamento com ansa de 10 µl, 2 placas de Agar Listeria segundo Ottaviani & Agosti (ALOA) e de Agar Oxford. Procedeu-se a um enriquecimento secundário por inoculação de 0,1 ml da cultura obtida no enriquecimento primário num tubo com meio seletivo líquido com concentração completa de agentes seletivos (Fraser). Incubou-se as placas a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durante $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$ e o tubo de Fraser a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durante $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$. De seguida procedeu-se à contagem das colónias características e isolamento (até 5 colónias) em placas com TSA. Por sua vez, inoculou-se por esgotamento com ansa de 10 µl do tubo de Fraser, 2 placas de ALOA e de Oxford. Incubou-se estas placas a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durante $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$. Repetiu-se a contagem das colónias caraterísticas e isolamento em placas com TSA. Todas as colónias caraterísticas foram confirmadas com testes bioquímicos.

Para a contagem, inoculou-se por espalhamento em meio ALOA duas alíquotas de, 0,5 ml e 0,1 ml da solução-mãe (procedimento descrito anteriormente para a pesquisa). Incubou-se as placas a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durante $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$. Procedeu-se à contagem das colónias características e isolamento (até 5 colónias) em placas com TSA para posterior confirmação com testes de bioquímicos.

3.7.7 Contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* (adaptado da ISO 6888-1,

1999/Amd 1:2003) - Inocularam-se, por espalhamento à superfície, duas alíquotas de 0,5 ml da solução-mãe e 0,1 ml da solução-mãe e diluições decimais seguintes para placas com meio Baird Parker (BP) com suplemento. Após incubação das placas a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durante $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$, selecionou-se as colónias características (até 5 colónias) para isolamento em TSA e posterior confirmação da produção de coagulase.

3.7.8 Pesquisa de *Salmonella spp.* (método rápido RAPID'Salmonella, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA, validado pela Association Française de Normalisation - AFNOR BRD-07/11-12-05, adaptado) - a solução-mãe foi

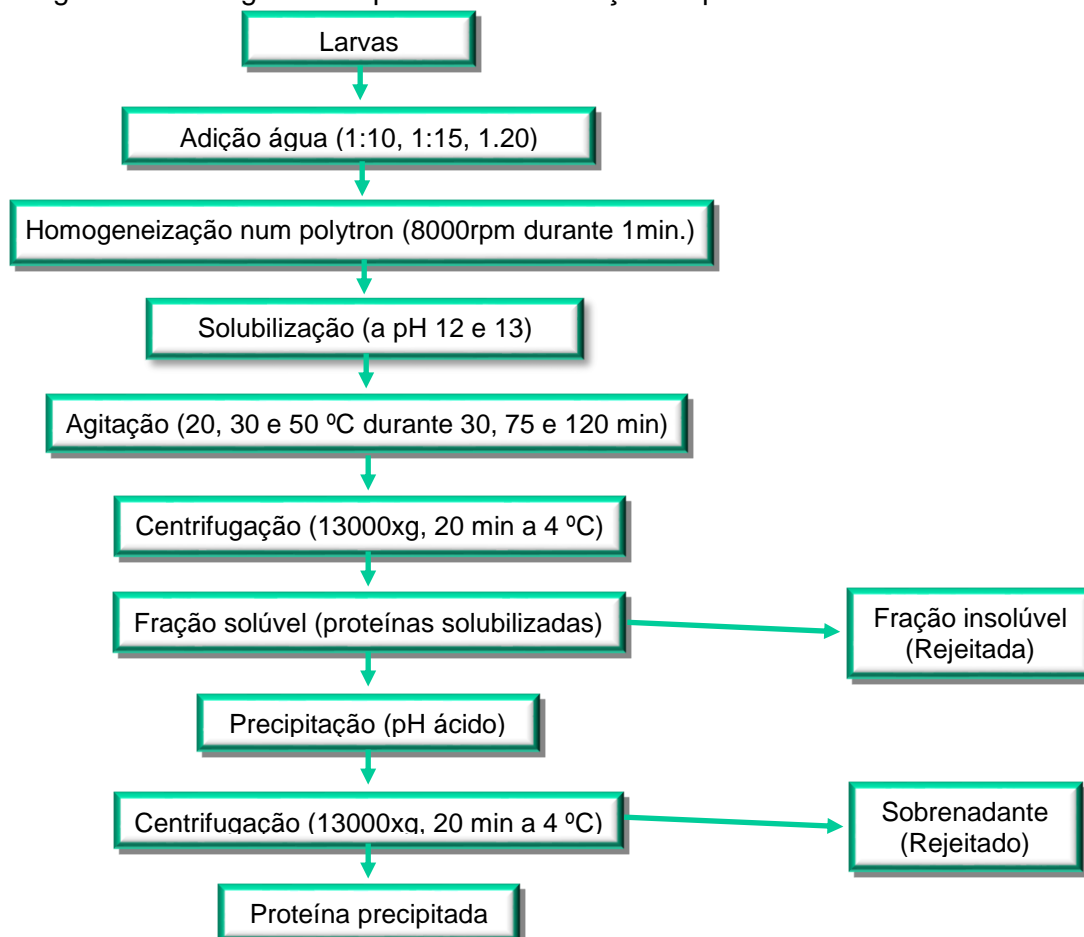
preparada com meio de enriquecimento APT ao qual foi adicionado uma cápsula seletiva (RAPID'Salmonella). Após incubação a $41\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante $18\text{ h} \pm 2\text{ h}$, inoculou-se por esgotamento com ansa de $10\text{ }\mu\text{l}$, 2 placas de meio Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) e 2 placas de meio RAPID'Salmonella. Após incubação das placas a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$, procedeu-se à seleção das colónias características nos dois meios (até 5 colónias de cada meio) em TSA para posterior confirmação com testes de bioquímicos.

As contagens foram expressas em unidades formadoras de colónias por grama (ufc/g), enquanto as pesquisas foram expressas como presença ou ausência em 25 g. O cálculo das ufc/g foi efetuado de acordo com a Norma ISO 7218 (2007/Amd 1:2013).

3.8 Método de extração da proteína de *Tenebrio molitor*

Na Figura 4 está representado o fluxograma genérico do processo de extração das proteínas de *Tenebrio molitor*. O método utilizado para a extração das proteínas de *Tenebrio molitor* teve como base a metodologia descrita por Batista et al. (2006), que consiste em duas etapas: a primeira envolveu a solubilização das proteínas a pH alcalino e a separação da fração insolúvel e a segunda a precipitação das proteínas no seu ponto isoelétrico.

Figura 4 – Fluxograma do processo de extração da proteína de *Tenebrio molitor*



Para a otimização das condições de solubilização das proteínas, foram usadas as condições referidas pelos autores Yang-Teng et al. (2014) e Xing-qian et al. (2001). Os ensaios efetuados encontram-se na tabela seguinte.

Tabela 5 – Ensaios de solubilização realizados para a otimização do processo de extração da proteína de *Tenebrio molitor*.

Ensaio (a)	Condições de solubilização			
	pH (b)	Proporção larva:água	Temperatura (°C)	Tempo de agitação (min)
1º	12	1:10	20	30
2º	13	1:10	20	30
3º	12	1:15	20	30
4º	12	1:20	20	30
5º	12	1:20	30	30
6º	12	1:20	50	30
7º	12	1:20	20	75
8º	12	1:20	20	120
9º	12	1:20	50	75
10º	12	1:20	50	120

(a) Cada condição foi testada em triplicado. (b) O ajuste de pH foi feito com NaOH a 2 M e HCl a 2 M

Para os dois ensaios que apresentaram uma melhor % solubilização, procedeu-se à precipitação da proteína, em triplicado, a diferentes valores de pH (2; 3; 4; 5; 5,8; 7,5). A determinação da % proteína no sobrenadante foi efetuada de acordo com o método descrito no ponto 3.2.4. Para o cálculo da % de rendimento utilizou-se a seguinte equação:

$$(\%) = \frac{\text{massa de azoto obtida no sobrenadante ou proteína recuperada (g)}}{\text{massa de azoto na massa pesada para o ensaio (g)}} * 100$$

A proteína foi de seguida liofilizada para posterior análise das propriedades reológicas e funcionais.

3.9 Propriedades Reológicas das proteínas extraídas de *Tenebrio molitor*

A caracterização reológica das proteínas extraídas foi efetuada num reómetro de tensão controlada (MARS III, Haake, Alemanha) acoplado a um sistema Peltier para controlo da temperatura. Foi utilizado um sistema de pratos paralelos serrados com 35 mm de diâmetro (PP35) e um gap de 0,5 mm. As proteínas foram suspensas em H₂O numa proporção proteína:água de 1:4 e o pH ajustado a 7 com NaOH.

Foram realizados varrimentos de tensão a 20 °C ± 1 °C, à frequência de 1 Hz de modo a definir a região de viscoelasticidade linear, isto é, a gama de tensões a que o material pode ser submetido sem sofrer destruição da estrutura do gel. Deste teste obtém-se o valor de tensão a utilizar nos ensaios oscilatórios de viscoelasticidade. Após a preparação das amostras, estas foram colocadas no reómetro para gelificação *in situ*, e cobertas com uma

camada de parafina líquida para evitar a desidratação da amostra. As condições do ensaio foram:

- a) Setting a 20 °C durante 5 min para equilibrar a amostra;
- b) Rampa de aquecimento entre 20 °C e 90 °C à taxa de 1 °C/min, a uma frequência de 1 Hz, tensão de 2 Pa;
- c) Setting a 90 °C durante 30 min, à frequência de 1 Hz e tensão de 10 Pa;
- d) Rampa de arrefecimento entre 90 °C e 5 °C (1 °C/min), à frequência de 1 Hz e tensão de 10 Pa;
- e) Maturação do gel a 5 °C durante 5 h, à tensão de 10 Pa e frequência de 1 Hz;
- f) Varrimento de frequência (0.010 Hz - 100.0 Hz) a 5 °C aplicando uma tensão de 10 Pa, obtendo-se o espectro mecânico do gel. Os valores do módulo elástico ou de armazenamento (G') e módulo viscoso ou dissipativo (G'') foram determinados ao longo do ensaio, indicando o tipo de organização da estrutura interna de cada amostra.

3.10 Caracterização e determinação das propriedades funcionais da proteína extraída de *Tenebrio molitor*

Uma vez que um dos objetivos deste trabalho era incorporar a proteína extraída de *Tenebrio molitor* num produto alimentar, procedeu-se à determinação de diferentes propriedades funcionais para avaliar qual o produto mais adequado.

3.10.1 Capacidade de absorção de água (WAC ou “water absorption capacity”) (de acordo com L'Hocine et al. (2006)) - Colocou-se num tubo 1g de proteína com 10 ml água, agitou-se num vortéx e centrifugou-se a 2060xg durante 10 min. Retirou-se para uma proveta a água libertada e mediu-se o seu volume. Foram realizadas 9 determinações para cada amostra e a equação utilizada no cálculo da WAC foi a seguinte:

$$\text{WAC (ml/g)} = \frac{\text{Volume de água adicionado (ml)} - \text{Volume de água libertado (ml)}}{m_{\text{amostra}} \text{ (g)}}$$

3.10.2 Capacidade de absorção de gordura (FAC ou “fat absorption capacity”) (de acordo com Zhao et al., 2016) - Colocou-se, em triplicado, 0,3 g de proteína num tubo e 3 ml de óleo vegetal. Após homogeneização durante 5 min, centrifugou-se a mistura a 2060xg, 10 min e retirou-se para uma proveta o óleo livre, procedendo-se à medição do volume. Os ensaios foram realizados em 12 réplicas e o cálculo foi efetuado com base na equação seguinte:

$$\text{FAC} = \frac{m_{\text{óleo retida na amostra}} \text{ (g)}}{m_{\text{amostra}} \text{ (g)}}$$

3.10.3 Solubilidade proteica (de acordo com Geirdottir et al., 2011) – Adicionou-se 2 g de proteína de *Tenebrio molitor* a 190 ml H₂O e homogeneizou-se a 800 rpm, 30 s num homogenizador (Polytron PT 3100D). Centrifugação a 16274xg durante 15 min e procedeu-se à determinação da % proteína usando o método referido no ponto 3.2.4. Os ensaios foram realizados em triplicado e o cálculo foi efetuado com base na fórmula seguinte:

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{\text{Concentração de proteína na solução (\mu\text{g/ml})} * 100}{\text{Concentração de proteína na amostra (\mu\text{g/ml})}}$$

3.10.4 Capacidade formação de espuma (FC ou “Foaming stability”) e estabilidade da espuma (FS ou “Foaming stability”) – A FC e FS foram determinadas de acordo com o descrito por Diniz & Martin (1997) com algumas alterações. Homogeneizou-se uma solução de 3 % de proteína em água com NaCl 0,1M. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 100 ml e aferiu-se o volume com H₂O purificada. Retirou-se 40 ml dessa solução para proveta de 50 ml e, num homogenizador (polytron PT 3100D) a 10000 rpm por 3 min, procedeu-se à formação de espuma. Para a FC mediu-se de imediato o volume de espuma formado, para a FS mediu-se o volume total após de 60 min de repouso. Os ensaios foram realizados em sextuplicado e o cálculo foi efetuado com base na fórmula seguinte:

$$\text{FC (\%)} = \frac{\text{Volume após formação da espuma (ml)} - \text{Volume inicial da solução (ml)}}{\text{Volume inicial da solução (ml)}} * 100$$

A estabilidade da espuma é considerada como a %espuma que permanece após 60min.

3.10.5 Índice de emulsificação (EAI ou “Emulsifying Activity Index”) (em concordância com Balti et al., 2010) - 30 ml de uma solução de 1 % de proteína foi adicionada a 10 ml de óleo vegetal e homogeneizada durante 30 s a 8000 rpm. Retirou-se 50 µl desta solução e adicionou-se a 5 ml de uma solução de SDS 0,1 %. A absorvância da mistura foi medida a 500 nm num espectrofotómetro UV-Vis Heyios da Unicam. O EAI foi determinado de acordo com a equação seguinte:

$$\text{EAI (m}^2\text{/g)} = \frac{2 * 2,303 * \text{absorvância} * \text{fator diluição}}{0,25 * \text{concentração (g/m}^3\text{)} * L}$$

sendo L o percurso ótico (0,01 mm).

3.10.6 Filtração gel - As proteínas presentes no sobrenadante após precipitação a pH 4 e as proteínas recuperadas em diferentes condições, foram caracterizadas por

filtração gel usando um cromatógrafo líquido FPLC AKTA (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden). O perfil de pesos moleculares foram determinados com uma coluna Superdex Peptide 10/300 GL (Amersham Pharmacia Biotech) e um detetor de UV a 280 nm. O eluente utilizado foi uma solução de Acetonitrilo a 30% com 0,1% de TFA e o fluxo foi de 0,5 ml/min. A curva de calibração foi efetuada com os padrões: ribonuclease A (13700 Da), aprotinina (6500 Da), angiotensina I (1296 Da), triglicina (194 Da) e glicina (75 Da).

3.10.7 Cor - Na determinação da cor as amostras foram analisadas num medidor Macbeth Color-Eye 3000 onde foram medidos os parâmetros da cor L^* , a^* e b^* . Estes parâmetros foram combinados de modo a obter os valores da brancura e do Croma de acordo com as equações: $W=100-[(100-L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$ e $C=(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$, respetivamente.

3.11 Eletroforese em SDS-Page

Os perfis das proteínas das várias diferentes frações (proteínas recuperadas, resíduo resultante da solubilização e sobrenadante resultante da precipitação) resultantes do processo de extração da proteína a 20 °C e a 50 °C, juntamente com amostra de larvas de *Tenebrio molitor*, foram determinados por SDS-PAGE.

Adicionou-se 112,5 mg (ou 112,5 µl da amostra líquida) a 2 ml de uma solução de Tris-HCl 60mM a pH 7,5 com 2% SDS e 10% mercaptoetanol e, aqueceu-se as amostras a 100 °C durante 3 min. Centrifugou-se a 12856 rpm por 15 min a 4 °C e, procedeu-se a ajuste da concentração da proteína a 0,3 mg/ml com a solução de aplicação (Tris-HCl 0,5 M a pH 6,8, SDS 4%, mercaptoetanol 10%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,1%). Uma alíquota de cada amostra foi aplicada num gel de EXCELGEL® SDS Homogeneous de 7,5% da BIO-RAD (Bio-rad, USA) assim como marcadores de alto-peso molecular (45, 66, 76, 97, 116, 170 e 220 kDa) e baixo peso molecular (20,1, 30,1, 43, 67 e 94 kDa), ambos da Amersham Biosciences (Piscataway, USA). As condições do ensaio foram: 600 V, 30 mA e 30 W. Os géis obtidos foram corados com Coomassie.

3.12 Confeção de produtos alimentares com proteína extraída de *Tenebrio molitor*

3.12.1 Para a produção das bolachas com proteínas extraídas de *Tenebrio* efetuou-se um teste preliminar, com a seguinte receita tradicional de biscoitos: 127 g de farinha de trigo, 165 g de amido de milho, 112 g de açúcar, 135 g de margarina, 64 g de leite e 4,5 g de aroma de baunilha. Adicionou-se 2 % (m/m) de proteína recuperada a 20 °C e a 50 °C. Juntaram-se todos os ingredientes e procedeu-se à sua homogeneização, primeiro com as mãos e, depois com uma batedeira, na

velocidade máxima, durante 2 min. De seguida, dividiu-se a massa em pequenas bolas, que foram dispostas num tabuleiro sobre papel de vegetal. A cozedura ocorreu a 180 °C por 20min. Foram igualmente confeccionadas bolachas controlo onde foram adicionados todos os ingredientes à exceção das proteínas extraídas de *Tenebrio molitor*.

Nos ensaios seguintes utilizou-se a seguinte receita de bolachas e apenas as proteínas extraídas a 20 °C:

1º Ensaio: 1 ovo, 100 g margarina, 125 g açúcar, 200 g de farinha de trigo, 50 g de linhaça amarela, 5 g de fermento, 4,5 g de aroma de baunilha e 32g de leite. Nesta receita utilizou-se 2% e 4% (m/m) de proteína extraída a 20 °C.

Juntaram-se todos os ingredientes e procedeu-se à sua homogeneização, primeiro com as mãos, e depois com uma batedeira, na velocidade média, por 2 min. Antes da adição da proteína recuperada, esta foi hidratada no leite durante 10 min. De seguida, a massa repousou a 5 °C durante 30 min. Após tender a massa sobre papel vegetal de forma a que a espessura fosse cerca de 0,5 cm, com um cortador circular, retirou-se vários discos de massa. Os discos foram dispostos num tabuleiro sobre papel vegetal e colocados no forno a 180 °C, 20 min

2º Ensaio: Dado que alguns provadores na análise sensorial das bolachas preparadas no 1º ensaio referiram que as bolachas eram um pouco secas e alguns conseguiam identificar as bolachas controlo pela cor, no 2º ensaio usaram-se as mesmas quantidades dos ingredientes e introduziram-se algumas alterações na receita: o tempo de cozedura foi reduzido para 10 min, substituiu-se a linhaça amarela por linhaça castanha e utilizou-se 8% (m/m) de proteína extraída. Fez-se também uma bolacha que, para além dos 8% de proteína recuperada, continha especiarias (5 g de canela, 0,3 g de cravinho, 2 g de gengibre e 0,6 g de noz-moscada) numa tentativa de melhorar o aroma e sabor das bolachas

Para os dois ensaios foram também confeccionadas bolachas controlo onde foram adicionados todos os ingredientes à exceção das proteínas extraídas de *Tenebrio molitor*.

3.12.2 Para a preparação das salsichas, utilizou-se uma receita base de salsichas tipo “Frankfurt”: 50% de proteína extraída de *Tenebrio molitor*, 15% azeite, 24% gelo, 3% de fécula de batata, 2,2% sal, 1,2% caseinato de sódio, 1% de concentrado de soja, 0,4% de condimentos de salsicha, 0,45% de glucose, 0,35% de polifosfatos, 0,35% de sal nitrificante, 0,1% de ácido ascórbico e 0,15% de aroma de fumo. Em paralelo utilizou-se como controlo uma salsicha preparada com os mesmos

ingredientes mas onde se adicionou 50% de carne de porco em vez de proteína extraída de *Tenebrio molitor*. A adição dos ingredientes foi efetuada de acordo com a tabela seguinte.

Tabela 6 – Ordem de adição dos diferentes ingredientes para a produção de salsichas e tempos de homogeneização

Ordem de adição	Ingredientes	Tempo de homogeneização (s)	Velocidade da bateadeira
1º	Proteína, sal, polifosfatos	60	1
2º	Gelo, glucose	30	1
3º	Caseinato de sódio, Concentrado de soja, ácido ascórbico	60	1
4º	Azeite	60	2
5º	Fécula de batata, condimentos e aroma	180	2

De seguida procedeu-se ao enchimento da tripa artificial com a pasta obtida. Após selagem da mesma, procedeu-se à sua cozedura a 85 °C por 5 min. Antes de desenformar, procedeu-se ao arrefecimento das salsichas num banho de água.

3.13 Análise sensorial

Com a análise sensorial, pretendia-se avaliar a aceitação do produto por parte de um painel de provadores e identificar algumas características a serem melhoradas. Para isso, foi realizado um teste de aceitação com a finalidade de avaliar os atributos de cor, aparência, textura, crocância, sabor e aroma. Usou-se uma escala hedónica estruturada de 7 valores, que variavam de 7 equivalente ao termo “Gostei muito” até 1 equivalente ao termo “desgostei muito” conforme ficha modelo (Anexo 3 e Anexo 4). O painel era constituído por 12 a 14 indivíduos de várias faixas etárias e de ambos os sexos. No final da prova foi pedido ao painel para referir a intenção de compra de cada um dos produtos.

As provas foram realizadas numa sala de análise sensorial, com cabines individuais e temperatura amena, sendo as amostras dispostas sobre pires brancos classificadas com letras de A a D, e apresentadas aos provadores de forma aleatória. As respostas dadas pelos provadores foram convertidas em índice de aceitabilidade (%) e que corresponde à média da classificação obtida pelo atributo sobre a nota máxima de classificação.

3.14 Caracterização das bolachas com proteína extraída de *Tenebrio molitor*

3.14.1 Composição proximal - A metodologia utilizada para determinar a composição proximal foi a descrita no ponto 3.2.

3.14.2 Cor - A cor foi medida com um colorímetro Chroma meter CR-410 da Konica Minolta (Tokyo, JAPAN), calibrado com uma placa branca para calibração (CR-A44). Os parâmetros avaliados foram os referidos no ponto 3.10.7.

3.14.3 Propriedades texturais - Para a determinação da dureza e fraturabilidade das bolachas, realizou-se um teste de Penetrometria num Texturómetro TA-XT plus (Stable Micro Systems, Godalming, Surrey, UK) com uma sonda cilíndrica em aço inoxidável de 2 mm (P/2), até atingir a profundidade de 4 mm, a uma velocidade 0,5 mm/s. Por cada bolacha foram feitas pelo menos 3 medições.

3.15 Tratamento estatístico dos resultados

Todos os resultados foram analisados estatisticamente através do software “STATISTICA 6” (Statsoft, Inc., Tulsa, OK74104, USA). O modelo linear da Anova unidirecional foi utilizado para determinar diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre várias condições, seguido por um teste de comparação múltipla (Tukey HSD).

Para a determinação das diferenças estatísticas entre duas condições, o teste de Fisher foi usado para avaliar a homogeneidade de variâncias, seguido do teste t-student.

Quando os dados não satisfizeram os requisitos, as diferenças foram analisadas com uma análise de variância não paramétrica (Kruskal–Wallis) seguido do teste de comparação múltipla (Mann–Whitney).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição química e teor de contaminantes

Na tabela seguinte apresentam-se os resultados obtidos para a composição química e teor de contaminantes das larvas de *Tenebrio molitor* e os valores referenciados, para os mesmos parâmetros, por outros autores.

Tabela 7 - Composição química e teor de contaminantes das larvas de *Tenebrio molitor*.

Larvas <i>Tenebrio molitor</i>			Ghaly et al. (2009)	Siemianowsk a et al. (2013)	Spang et al. (2013)	Yi et al. (2013)	Weman s (2015)
Humidade (%)	69,8 ± 1,4	n= 6	58,1 a 61,5	56,1	---	63,5	59,36
Cinza (%)	1,23 ± 0,00	n= 3	1,8 a 2,2	1,55	---	---	---
Proteína (%)	18,0 ± 1,9	n= 6	24,3 a 27,6	17,91	18,7 a 22,4	19,1	17,7*
Gordura (%)	10,4 ± 1,2	n= 6	12,0 a 12,5	21,3	---	9,9	7,2*
Quitina (%)	1,60 ± 0,28	n= 4	---	---	---	---	---
(mg/g)	15,97 ± 2,81						
			Valores legislados pelo EC N.º 1881, 2006 e EC N.º 629, 2008 para crustáceos	Diener et al., 2015 para larva de <i>Hermetia illucens</i>	Vijver et al., 2003 para <i>Tenebrio molitor</i>		
Hg total (ppm)	< LD	n= 3	0,50 ppm	---		---	
Cd (ppm)	0,10 ± 0,00	n= 3	0,50 ppm	0,2 a 170,5		0,08 a 21,2	
Pb (ppm)	< LD	n= 3	0,50 ppm	---		---	

Nota: Limite de deteção (LD) é de 0,02ppm. Os resultados apresentados correspondem à média ± desvio padrão. (*) Valor calculado com base na % humidade.

Em termos de composição química, as larvas de *Tenebrio molitor* apresentaram um elevado teor proteico (18,0 %) e lipídico (10,4 %). O teor de humidade obtido (69,8%) foi superior aos valores referenciados para larvas de *Tenebrio molitor* por Ghaly et al. (2009), Yi et al. (2013), Siemianowska et al. (2013) e Wemans (2015). No entanto, o teor de gordura (10,42%) encontrava-se na gama dos valores obtidos pelos mesmos autores. Ghaly et al. (2009), Yi et al. (2013) e Spang et al. (2013) referem valores de proteína ligeiramente acima, mas Siemianowska et al. (2013) e Wemans (2015) obtiveram valores semelhantes. O teor de cinza (1,23%) é também semelhante ao obtido por Ghaly et al. (2009) e Siemianowska et al. (2013). No que se refere aos contaminantes, não foi possível quantificar os teores de mercúrio e chumbo, uma vez que, os valores obtidos foram inferiores ao limite de deteção do método. Para o cádmio, o valor obtido (0,10 ppm) é um pouco elevado, no entanto, tendo em consideração o limite máximo permitido (EC N.º 1881, 2006 e EC N.º 629, 2008) para os crustáceos (pertencentes aos mesmo filo que os insetos) este valor encontrava-se abaixo. Comparativamente com outros autores, o valor foi mais baixo do que o obtido para larvas de *Hermetia illucens* (Diener et al., 2015) mas na gama de valores das larvas de *Tenebrio molitor*.

(Vijver et al., 2003). Relativamente a outras fontes de proteína animal (Figura 3), os valores obtidos para a percentagem de proteína das larvas de *Tenebrio molitor* estavam dentro da gama de resultados referenciados.

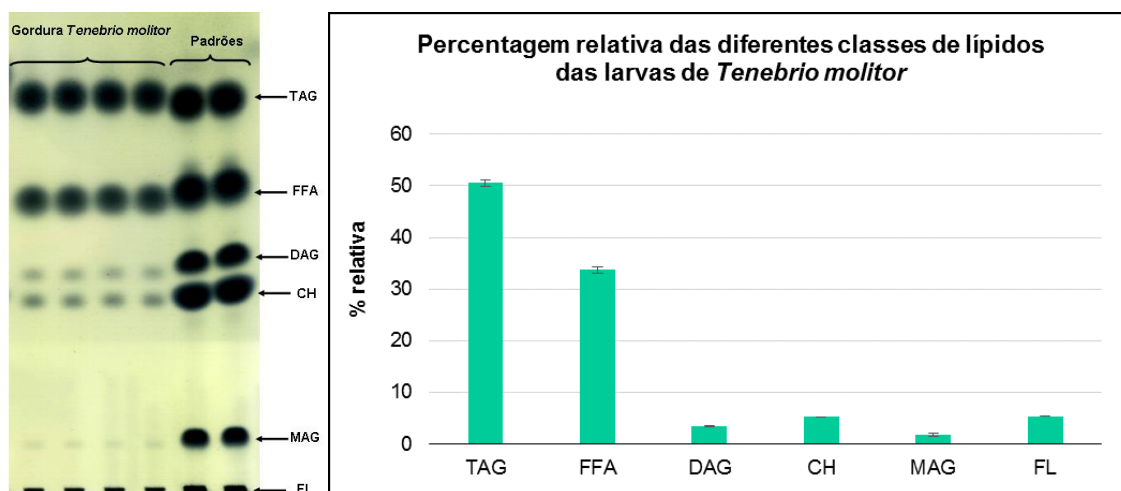
Uma grande parte do teor de contaminantes presentes nos insetos está relacionado com os níveis existentes nos solos e alimentos com que estes entram em contato. Era expectável que o nível destes contaminantes fosse baixo, uma vez que, as larvas de *Tenebrio molitor* foram produzidas em ambiente controlado e foi-lhes fornecido alimento igualmente controlado. No entanto, os níveis de cádmio obtidos poderão advir do alimento fornecido às pois para o farelo de trigo o limite máximo deste contaminante é 0,20 ppm e nos vegetais como a cenoura de 0,10 ppm, de acordo com os regulamentos supracitados.

As larvas de *Tenebrio molitor* apresentaram um teor de quitina de 15,97 mg/kg (1,60%). Apesar de não existir muita bibliografia sobre o teor de quitina em larvas de *Tenebrio molitor*, Finke et al. (2007) estimou um valor de 19,6 mg/kg, que se encontrava próximo do valor obtido neste estudo.

4.2 Caracterização da Fração lipídica

Na Figura 5 estão representadas as % relativas das diferentes classes de lípidos que existiam na fração lipídica das larvas de *Tenebrio molitor*.

Figura 5 - TLC analítica e classes de Lípidos (% relativa) da fração lipídica das larvas de *Tenebrio molitor*



Vários autores referem que as classes de lípidos maioritariamente presentes nos insetos são os TAG, DAG, fosfolípidos e hidrocarbonetos e ceras (Horne et al. 2009 e Beenakkers et al. 1985) mas também se podem encontrar MAG e FFA dependendo da espécie (Beenakkers et al. 1985). De fato os TAG são a forma na qual os lípidos são principalmente armazenados na massa gorda dos insetos (Horne et al. 2009 e Beenakkers et al. 1985) mas poderão existir

outras classes em menor percentagem como os FFAs (Beenackers et al. 1985). Os DAG são a forma sob a qual os lípidos, nos insetos, são preferencialmente transportados (Horne et al. 2009) mas também é possível encontrar na hemolinfa TAG, FFA e FLs (Beenackers et al. 1985).

Verificou-se que os triacilgliceróis (TAG) foram a classe de lípidos predominante (50,6%) seguida dos ácidos gordos livre (FFA) (33,7%). A percentagem de colesterol (CH) e de fosfolípidos (FL) foi 5%, de diacilgliceróis (DAG) 3,4% e dos monoacilgliceróis (MAG) 1,7%. Comparativamente com os resultados obtidos por Wemans (2015) para larvas de *Tenebrio molitor*, o valor obtido para as diferentes classes de lípidos foi superior com exceção da fração dos TAG e do somatório da fração de CH. Esta diferença é explicada pelo fato da fração lipídica nas larvas analisadas por este autor apresentarem também ésteres de colesterol e hidrocarbonetos.

A elevada percentagem de ácidos gordos livres pode estar relacionada com os seguintes aspetos:

- o *Tenebrio molitor* encontrava-se na fase larvar que, de acordo com Mauldin et al. (1971), é a fase onde apresenta maior proporção de FFAs;
- durante o período de privação de alimento as lípases foram ativadas para proceder à mobilização dos lípidos existentes nas reservas promovendo a hidrólise dos TAG libertando para a hemolinfa DAGs e FFAs (Horne et al. 2009);
- durante o processo de moagem das larvas, as lípases existentes nos insetos procederam à hidrólise dos TAG porque estes estavam mais disponíveis, aumentando a proporção de FFAs.

Analisando os valores obtidos para os ácidos gordos (Tabela 8), verificou-se que o nível de ácidos gordos monoinsaturados (MUFAs) foi superior ao dos polinsaturados (PUFAs) e saturados (SFAs). Este fato deveu-se provavelmente à dieta ser constituída à base de produtos vegetais (farelo de trigo e cenoura) onde predominava maioritariamente o ácido oleico (18:1n9). De facto, o ácido linoleico (18:2n6) foi o segundo ácido gordo predominante, seguido do palmítico (16:0).

Também no perfil de ácidos gordos obtido por Finke (2002), Tzompa-Sosa et al (2014) e Wemans (2015), o ácido oleico foi o ácido gordo maioritário, seguido do linoleico e do palmítico.

Os valores obtidos para o 18:1n9, 18:2n6 e 16:0 foram superiores aos valores obtidos por Wemans (2015) mas inferiores aos valores obtidos para o ácido oleico e palmítico por Finke (2002) e Tzompa-Sosa et al. (2014). No entanto, os valores de linoleico (18.2n6) foram semelhantes aos obtidos pelos autores Finke (2002) e Tzompa-Sosa et al. (2014).

Tabela 8 - Perfil de ácidos gordos das larvas de *Tenebrio molitor* (n=6)

Ácidos gordos	Valor (g/100g massa edível)	Valor (%)	Wemans (2015) ^(a)		Tzompa-Sosa et al (2014) ^(b)	
			(g/100g massa edível)	(%)	(g/100g massa edível)	(%)
Saturados						
12:0	0,03 ± 0,01	0,3 ± 0,1	---	---	0,02	0,1
14:0	0,39 ± 0,07	4,0 ± 0,5	0,12	1,9	0,41	3,2
16:0	1,47 ± 0,14	15,3 ± 0,6	1,20	18,2	2,23	17,4
18:0	0,26 ± 0,01	2,7 ± 0,0	0,26	3,9	0,36	2,7
Outros saturados	0,1 ± 0,01	1,0 ± 0,0	0,06	0,9	---	---
Total	2,22 ± 0,23	23,0 ± 1,1	1,67	36,3	3,03	23,6
Monoinsaturados						
16:1	0,27 ± 0,03	2,8 ± 0,1	0,12	1,7	0,35	2,7
18:1n9	3,63 ± 0,15	38,1 ± 0,7	2,40	36,3	6,34	49,3
18:1	3,66 ± 0,16	0,1 ± 0,0	2,41	35,9	6,36	49,4
20:1	0,01 ± 0,00	0,0 ± 0,0	0,01	0,2	---	---
Total	3,94 ± 0,18	41,0 ± 0,6	2,54	38,5	6,71	52,2
Polinsaturados						
18:2n6	3,19 ± 0,14	33,2 ± ‘,5	2,25	34,1	3,01	23,4
18:3n3 (ALA)	0,14 ± 0,01	1,5 ± 0,0	0,12	1,7	0,11	0,9
20:4n6 (ARA)	---	---	---	---	---	---
20:5n3 (EPA)	---	---	---	---	---	---
22:5n3 (DPA)	---	---	---	---	---	---
22:6n3 (DHA)	---	---	---	---	---	---
Outros Polinsaturados	0,03 ± 0,00	0,3 ± 0,0	0,03	0,5	---	---
Total	3,37 ± 0,15	35,1 ± 0,6	2,40	36,3	3,12	24,3
Total n-3	0,15 ± 0,01	1,6 ± 0,0	0,12	1,9	0,11	0,9
Total n-6	3,20 ± 0,14	33,3 ± 0,5	2,26	34,2	3,01	23,4
Razão n-6/n-3	20,75 ± 0,28	20,8 ± 0,3	18,47	---	25,98	---
Total ácidos gordos	9,53 ± 0,54	99,2 ± 0,1	6,61	100,0	12,87	100,0

Os resultados apresentados correspondem à média ± desvio padrão.

(a) Valores calculados com base na %gordura em peso húmido, determinada com a %humidade obtida pelo autor. (b) Valores calculados com base na %gordura obtida pelo autor.

Neste estudo, não se obteve nenhum pico do EPA e DHA mas o mesmo se verificou nas amostras analisadas por outros autores (Finke, 2002, Ravzanaadii et al., 2012, Tzompa-Sosa et al., 2014 e Wemans, 2015). Os valores obtidos para o ácido esteárico (18:0) e o ALA

(18:3n3), encontravam-se na mesma gama que os referidos na literatura (Tzompa-Sosa et al., 2014 e Wemans, 2015). O somatório dos totais de SFAs, MUFAs e PUFA's foi superior ao obtido por Wemans (2015), sendo este fato expectável dado que a percentagem de gordura das larvas de *Tenebrio molitor* neste estudo (Tabela 7) foi também superior.

Relativamente à razão ácidos gordos n-6/n-3 (20,75) o valor obtido foi inferior ao reportado por Tzompa-Sosa et al. (2014) (25,98) e por Wemans (2015) (18,47). O fato de este índice ser elevado é indicativo que a proporção de ácidos gordos n6 é superior aos ácidos gordos n-3 e, em termos de benefícios para a saúde, o ideal era que esta proporção fosse inversa. Para as larvas de *Tenebrio molitor* apresentarem um maior teor em ácidos gordos n-3, seria necessária uma alteração na dieta fornecida incluindo, por exemplo, uma fração de produtos da pesca (conhecidos por apresentarem teores elevados de n-3 PUFA's).

4.3 Perfil de aminoácidos

No que se refere ao teor de aminoácidos (Tabela 9) as larvas de *Tenebrio molitor* apresentavam um teor elevado dos aminoácidos prolina, alanina, ácido aspártico e ácido glutâmico (acima das 60 mg/g de proteína). Esta espécie revelou-se também como uma excelente fonte dos aminoácidos essenciais histidina, treonina, fenilalanina e tirosina, pois contribui em mais de 100% dos valores recomendado pela FAO (2013). É, de igual modo, uma boa fonte de outros aminoácidos essenciais como a valina, isoleucina e leucina.

Comparativamente com outras fontes de proteína (ver na introdução a Tabela 2), os teores dos diferentes aminoácidos quantificados foram superiores, com exceção do pescado. Relativamente aos valores de aminoácidos referidos por outros autores para larvas de *Tenebrio molitor*, os valores obtidos foram em geral sempre superiores, à exceção da lisina. No caso do triptofano, metionina e cisteína, não foi possível a quantificação destes aminoácidos pelo valor estar abaixo do limite de quantificação. O fato de se ter utilizado uma metodologia com uma hidrólise ácida, poderá ter levado à destruição parcial do triptofano e da cisteína e a oxidação da metionina e assim os valores obtidos poderão estar subestimados (Rutherford & Gilani, 2009).

Tabela 9 - Perfil de aminoácidos obtido (n=6) para as larvas de *Tenebrio molitor*

	Larvas <i>Tenebrio molitor</i>		%DDR FAO, 2013 *	Ravzanaadii et al, 2012 (a)	Finke 2002 (b)	Zielińska et al, 2015 (c)
	(g/100g em peso seco)	mg/g Proteína		(g/100g em peso seco)		
Ácido aspártico (ASP)	3,74 ± 0,14	62,54 ± 2,28		1,67	1,52	2,64
Ácido glutâmico (GLU)	4,81 ± 0,18	80,42 ± 3,05		2,64	2,11	4,17
Asparagina (ASN)	<LQ	<LQ		---	---	---
Serina (SER)	2,23 ± 0,08	37,29 ± 1,31		0,97	0,96	1,51
Glutamina (GLN)	<LQ	<LQ		---	---	---
Histidina (HIS)	1,11 ± 0,05	18,57 ± 0,78	111%	0,71	0,59	0,84
Glicina (GLY)	2,53 ± 0,08	42,34 ± 1,38		1,12	1,04	1,66
Treonina (THR)	2,11 ± 0,08	35,19 ± 1,27	140%	0,84	0,77	1,37
Arginina (ARG)	1,75 ± 0,08	29,24 ± 1,34		1,13	0,97	1,34
Alanina (ALA)	3,88 ± 0,09	64,77 ± 1,59		1,71	1,54	2,32
Tirosina (TYR)	2,58 ± 0,08	43,11 ± 1,37		1,61	1,37	1,51
Cisteína (CYS)	<LQ	<LQ		0,24	0,16	0,29
Valina (VAL)	1,89 ± 0,06	31,56 ± 1,05	73%	1,13	1,1	2,08
Metionina (MET)	<LQ	<LQ		0,31	0,24	0,50
Triptofano (TRP)	<LQ	<LQ		---	0,15	---
Fenilalanina (PHE)	1,32 ± 0,06	22,03 ± 1,00		0,82	0,66	0,84
Isoleucina (ILE)	1,23 ± 0,04	20,58 ± 0,74	62%	1,65	0,94	1,12
Leucina (LEU)	2,91 ± 0,09	48,70 ± 1,53	75%	1,58	1,99	2,40
Lisina (LYS)	1,00 ± 0,06	16,79 ± 0,92	33%	1,35	1,02	1,40
Prolina (PRO)	3,68 ± 0,10	61,53 ± 1,72		1,40	1,3	2,27
MET+CYS	<LQ	<LQ	*	0,55	0,4	0,79
PHE+TYR	3,90 ± 0,13	65,18 ± 2,17	156%*	2,42	2,03	2,35
Total de a.a.	36,78 ± 1,08	614,66 ± 18,13		20,88	18,43	28,26
Total a.a. essenciais	14,15 ± 0,46	236,49 ± 7,69		11,85	10,21	13,85

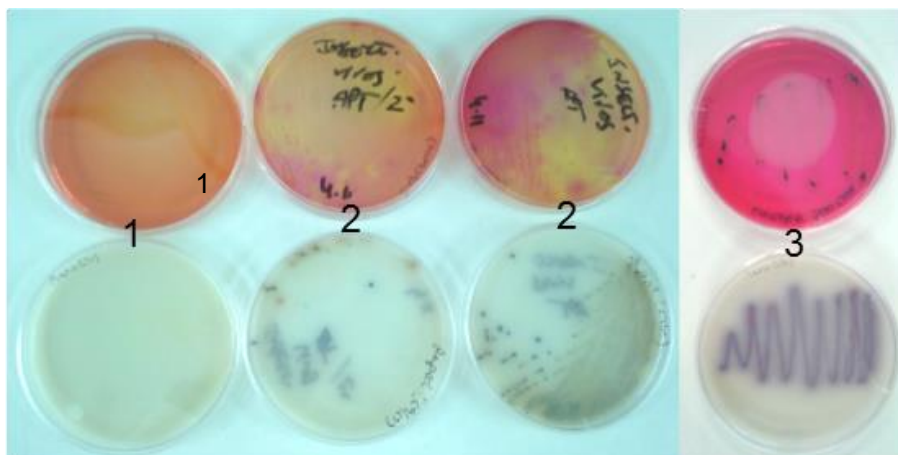
Nota: * dose diário recomendado pela FAO, 2013 para os aminoácidos essenciais para um humano com idade >18 anos. O intake de metionina é considerado em conjunto com a cisteína e o da fenilalanina com a tirosina. LQ = 9 pmol/μl. Os aminoácidos sinalizados a cinza são considerados aminoácidos essenciais. Os resultados apresentados correspondem à média ± desvio padrão. (a) Valores convertidos de g/100g de proteína para g/100g de massa *Tenebrio molitor* usando a %proteína (46,44%) determinada pelos autores. (b) Valores convertidos de g/kg para g/100g. (c) Valores convertidos de mg/g de proteína para g/100g de massa *Tenebrio molitor* usando a %proteína (52,35%) determinada pelos autores.

4.4 Caracterização microbiológica das larvas de *Tenebrio molitor*

Foi efetuada uma avaliação da microbiota das larvas de *Tenebrio molitor* para os parâmetros de qualidade e higiene (bactérias aeróbias mesófilas totais, bolores e leveduras, *Enterobacteriaceae*, coliformes, *E. coli* e *Staphylococcus coagulase positiva*) ao fim do primeiro e nono dias após a colheita, em condições de refrigeração, com o intuito de verificar se ocorria uma redução na carga microbiana das larvas de insetos, devido à privação de alimento, como descrito por alguns autores (Superior Health Council, 2014) e observado em mamíferos terrestres e aves. Quanto aos microrganismos patogênicos (*Listeria*

monocytogenes e *Salmonella* spp.), que estavam ausentes em 25 g de produto no primeiro dia após a colheita, não foram determinados no dia nove pós colheita. Nas Figura 6 e Figura 7 estão identificadas as placas com os respectivos meios de cultura utilizados na pesquisa de *Salmonella* spp e de *Listeria monocytogenes*, respectivamente.

Figura 6 – Crescimento obtido nas placas de XLD e Rapid para a pesquisa de *Salmonella* spp.



Legenda: 1- meios sem inóculo da amostra; 2- Meios inoculados com larvas de *Tenebrio molitor* após incubação; 3- Meios inoculados com estirpe de *Salmonella* spp. (colônias características de cor arroxeada no Rapid e vermelhas com centro preto no XLD).

Figura 7 – Crescimento obtido nas placas de Oxford e ALOA para a pesquisa de *Listeria monocytogenes*



Legenda: 1- Meios sem inóculo da amostra; 2- Meios inoculados com *Listeria* inócua, *Listeria monocytogenes* (as colônias características de *Listeria monocytogenes*. no Oxford são de cor preta com halo preto e no ALOA são verde com um halo transparente).

No que respeita aos parâmetros indicadores de qualidade e higiene, os resultados encontravam-se apresentados na Tabela 10 (expressos em log ufc/g).

Constatou-se que os níveis iniciais de contaminação por bactérias aeróbias mesófilas totais foram bastante elevados (7,8 log ufc/g) e a privação de alimento durante oito dias originou uma redução de 0,7 log ufc/g para este parâmetro. Observou-se que os níveis iniciais de contaminação por bolores e leveduras foram relevantes (5 e 6 log ufc/g, respetivamente). A privação de alimento durante oito dias originou uma redução de apenas 0,2 log ufc/g para os bolores, no entanto, para as leveduras verificou-se uma redução considerável de 2,2 log ufc/g.

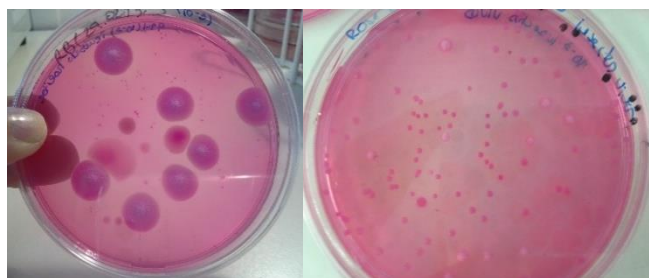
Tabela 10 – Valores obtidos para diferentes parâmetros microbiológicos (log ufc/g)

Parâmetros microbiológicos	1 dia após colheita log(ufc/g)	9 dias após colheita log(ufc/g)
Bactérias aeróbias mesófilas totais	7,8	7,1
Bolores	5,0	4,8
Leveduras	6,0	3,8
Bactérias aeróbias mesófilas formadoras de esporos	3,8	2,8
Bactérias anaeróbias mesófilas formadoras de esporos	4,1	2,2
<i>Enterobacteriaceae</i>	6,6	6,2
Coliformes totais	6,6	5,8
<i>E. coli</i>	< LD	< LD
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	< LD	< LD

Legenda: (limite de detecção) (LD) = $1,0 \times 10^5$ ufc/g ou 1log

A figura seguinte corresponde à imagem visual obtida numa placa de RB, após inoculação e incubação.

Figura 8 – Resultado visual obtido nas placas de RB para a contagem de bolores se fungos.



Relativamente às bactérias aeróbias e anaeróbias mesófilas formadoras de esporos, registaram-se teores iniciais de 3,8 e 4,1 log ufc/g, respetivamente, tendo-se obtido um decréscimo (1 e 1,9 log respetivamente) após oito dias de privação de alimento.

As figuras seguintes representam o aspeto visual das colónias que cresceram nas placas de VRBGA, CHR e TBX, para a contagem de *Enterobacteriaceae*, coliformes totais e de *E. coli*, respetivamente.

Figura 9 – Resultado visual obtido nas placas de VRBGA para a contagem de *Enterobacteriaceae*.

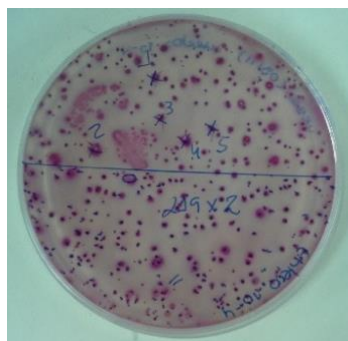
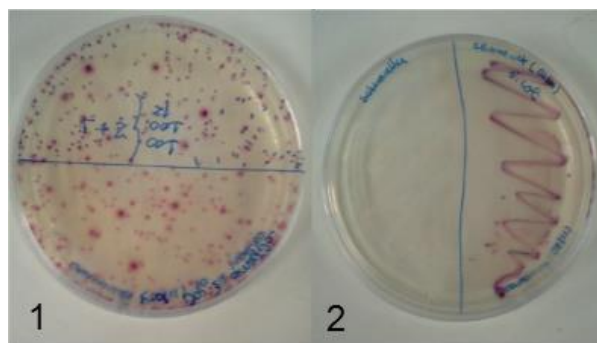
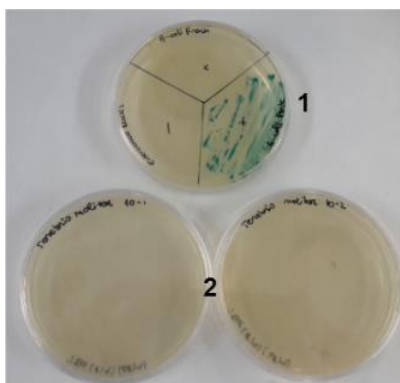


Figura 10 – Resultado visual obtido nas placas de CHR para a contagem de coliformes totais.



Legenda: 1- Placa com meio inoculada com larvas de *Tenebrio molitor* após incubação (coliformes surgem no CHR como colônias com cor vermelhas e a *E. coli* surge como colônias arroxeadas); 2- Placa com meio inoculado com estirpes de referência: *Salmonella* spp (controle negativo). e *E. coli* (controle positivo).

Figura 11 – Resultado visual obtido nas placas de TBX para a contagem de *E. coli*.



Legenda: 1-Meios inoculados com estirpes de referência: *E. coli* (controle positivo surgem no TBX com cor verde), e *Enterococcus faecalis* (controle negativo); 2- Meios com inoculo das larvas de *Tenebrio molitor* após incubação.

Quanto às *Enterobacteriaceae* e coliformes, registaram-se teores iniciais de 6,6 log ufc/g para ambos e um decréscimo de apenas 0,4 log ufc/g e de 1,1 log ufc/g, respetivamente, após oito dias de privação de alimento.

No que respeita à *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva, os teores registados foram sempre inferiores ao limite de deteção (< 1 log ufc/g), nos dois períodos analisados. Os níveis observados para *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva estavam de acordo com os limites propostos (Bureau Risicobeoordeling & onderzoeksprogrammering, 2014), no entanto os níveis obtidos para bactérias aeróbias mesófilas totais, *Enterobacteriaceae* e coliformes foram superiores ao limite habitualmente considerado como característico (≤ 5 a 7 log ufc/g para bactérias mesófilas totais e ≤ 2 a 3 log ufc/g para as *Enterobacteriaceae*) em carne picada e preparados de carne.

Comparando os resultados da Tabela 10 com os obtidos para larvas de *Tenebrio molitor* pelos autores Klunder et al. (2012), foram obtidos os mesmos teores de bactérias mesófilas totais e *Enterobacteriaceae* (na ordem 10^7). O valor para as bactérias aeróbias mesófilas formadoras de esporos obtido por estes autores foi inferior (na ordem 10^2). Os mesmos autores referem

que a aplicação de um tratamento térmico, como a cozedura no forno, é suficiente para inativar as *Enterobactereaceas* mas não os esporos produzidos por bactérias quando sujeitas a condições de stress. Assim sendo, para evitar uma contagem alta de bactérias formadoras de esporos, seria necessária a aplicação de medidas de controlo higiénico-sanitárias nas instalações, no alimento fornecido e no manuseamento das próprias larvas durante a sua produção. Adicionalmente a estas medidas, dever-se-ia proceder a um tratamento térmico das larvas antes do seu consumo. Belluco et al. 2013 reportaram contagens elevadas (na ordem 10^5 a 10^6) para as bactérias totais e, tal como neste estudo, não detetaram *Salmonella spp* e *Listeria monocytogenes* nas amostras testadas.

De um modo geral, apesar da maioria dos parâmetros terem apresentado níveis elevados, este fato não foi considerado relevante para a preparação de um produto alimentar com a proteína extraída de *Tenebrio molitor* ou as suas larvas moídas, uma vez que esta matéria-prima foi sujeita a condições de pH extremas (pH de 12 e de 4) durante o processo de extração e, posteriormente incorporada num produto alimentar que sofreu um tratamento térmico (180 °C, 10-15min). Em termos microbiológicos, no que se refere ao manuseio das larvas de *Tenebrio molitor*, recomenda-se que haja uma privação de alimento de alguns dias antes da sua colheita, uma vez que neste estudo se observou que a privação durante 8 dias originou uma redução de pelo menos 90% nos teores de leveduras, bactérias aeróbias e anaeróbias esporuladas e coliformes.

4.5 Método de extração da proteína de *Tenebrio molitor*

O método utilizado para a extração das proteínas de *Tenebrio molitor* consistia em duas etapas, a primeira de solubilização das proteínas e a segunda a sua precipitação no ponto isoelétrico. Na etapa de solubilização das proteínas foram testadas diferentes condições e os resultados obtidos estão apresentados na tabela seguinte.

Com base nos resultados obtidos (Tabela 11) pode concluir-se que a solubilização a pH12 utilizando uma proporção de larvas:água de 1:20 era a que permitia obter uma percentagem de solubilização mais elevada. No que diz respeito à temperatura, obteve-se uma maior percentagem na solubilização realizada a 50 °C. No entanto, como esta temperatura é muito elevada e durante o processo poderia ocorrer hidrólise ou desnaturação proteica, e uma vez, que não houve diferenças significativas entre os resultados obtidos a 20 e 35 °C, selecionou-se também a temperatura de 20 °C para o ensaio seguinte. Quanto ao tempo de agitação, constatou-se que, tanto a 20 °C como a 50 °C não existiam diferenças significativas entre agitar a solução durante 30 ou 120 min. Por isso, selecionou-se o menor tempo de agitação (30 min) para a temperatura de 20 °C e, para a temperatura de 50 °C selecionou-se o valor de tempo no qual a % de solubilização foi maior e no qual os autores Yan-Teng et al. (2014) obtiveram igualmente melhor rendimento de extração.

Tabela 11 – Percentagem de solubilização da proteína de *Tenebrio molitor* obtida em diferentes condições de solubilização (n=6 para cada condição)

pH	Proporção larvas:água	Temperatura (°C)	Tempo de agitação (min)	% Solubilização
12	1:10	20	30	68,9 ± 1,9 ^I
13	1:10	20	30	43,0 ± 0,2 ^{II}
12	1:10	20	30	68,9 ± 1,9 ^a
12	1:15	20	30	77,1 ± 2,3 ^b
12	1:20	20	30	83,1 ± 1,7 ^c
12	1:20	20	30	83,1 ± 1,7 ^A
12	1:20	35	30	84,8 ± 1,0 ^B
12	1:20	50	30	88,5 ± 1,1 ^C
12	1:20	20	30	83,1 ± 1,7 ^{i,ii}
12	1:20	20	75	82,7 ± 0,7 ⁱⁱ
12	1:20	20	120	84,6 ± 1,3 ⁱ
12	1:20	50	30	88,5 ± 1,1 ^{*,**}
12	1:20	50	75	88,3 ± 1,3 ^{**}
12	1:20	50	120	90,3 ± 1,8 [*]

Os resultados da % solubilização correspondem à média ± desvio padrão. Valores com diferentes letras/símbolos na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0.05$). O modelo linear da Anova unidirecional foi utilizado para determinar diferenças estatísticas entre as várias condições para o mesmo parâmetro, seguido por um teste de comparação múltipla (Tukey HSD). Para a determinação das diferenças estatísticas entre duas condições de pH diferentes, o teste t-student foi usado. As duas condições selecionadas para a segunda etapa do processo encontram-se assinaladas a cinza.

Assim, as duas condições de solubilização selecionadas foram:

- 20°C e 30 min de agitação;
- 50°C e 120 min de agitação.

A percentagem de solubilização obtida neste trabalho para uma extração realizada com uma proporção larvas:água de 1:20, a 50 °C e com um tempo de agitação de 120 min, foi superior ao obtido por Yan-Teng et al. (2014). A diferença obtida poderá ser devido à espécie de inseto ou a metodologia utilizadas. No entanto, as condições ótimas de solubilização encontradas e a percentagem de proteína obtida (90,3%) não diferiam muito das referidas por estes autores. Xing-qian et al. (2001) procederam a um estudo sobre a solubilidade das proteínas de *Tenebrio molitor* obtendo uma percentagem de solubilização maior a pH12 e com uma proporção de 1:15 de larvas:água. No entanto, as percentagens de solubilização obtidas a diferentes temperaturas 15, 30 e 45 °C, não foram significativamente diferentes. Mais uma vez, os resultados de percentagem de solubilização obtidos neste trabalho para as condições selecionadas foram superiores aos obtidos por Xing-qian et al. (2001).

A 2ª etapa do processo de extração, precipitação no ponto isoelétrico, foi efetuada para ambas as condições de solubilização selecionadas. De modo a selecionar o valor de pH ao qual ocorre maior percentagem de precipitação de proteínas efetuou-se a precipitação das proteínas solubilizadas a diferentes pH e os resultados estão apresentados na tabela seguinte.

Tabela 12 - Resultados obtidos (%proteína relativamente ao teor inicial) na precipitação das proteínas a diferentes pH (n=6 para cada condição)

pH	Extração a 20 °C	pH	Extração a 50 °C
2	50,7 ± 2,2 ^{ab}	2	46,2 ± 1,8 ^a
3	51,8 ± 2,4 ^{ab}	3	48,9 ± 1,8 ^{ab}
4	53,4 ± 2,5 ^{ab}	4	51,5 ± 2,2 ^b
5	54,4 ± 2,5 ^b	5	51,0 ± 3,0 ^b
5,8	52,5 ± 2,5 ^{ab}	5,8	50,3 ± 1,7 ^b
7	47,4 ± 6,1 ^a	7	25,1 ± 2,1 ^c

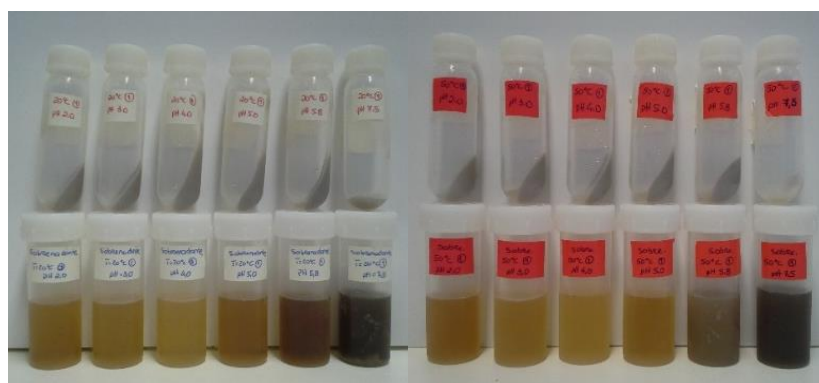
Os resultados da % proteína correspondem à média ± desvio padrão. Valores com diferentes letras na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0.05$). O modelo linear da Anova unidirecional foi utilizado para determinar diferenças estatísticas entre várias condições, seguido por um teste de comparação múltipla (Tukey HSD). A cinza está assinalado o pH selecionado após análise estatística.

A percentagem de proteína extraída foi mais baixa, a ambas a temperaturas de solubilização (20 e 50°C), quando a precipitação era realizada a pH 7. A 20°C o valor mais elevado foi atingido a pH 5, no entanto, este valor não difere estatisticamente dos obtidos a pH 2, 3, 4 e 5,8. Quando a solubilização ocorria a 50°C, a % extração de proteína era mais elevada a pH 4, mas este valor não era significativamente diferente do obtido a pH 3, 5 e 5,8.

Tendo em conta os resultados obtidos na precipitação da proteína de *Tenebrio molitor* e apesar de não haver diferenças significativas entre os resultados obtidos a pH 4 e pH 5, selecionou-se o pH 4 para a precipitação da proteína a ambas as temperaturas. Para além disso, o sobrenadante final obtido após a precipitação a pH 4 era o que se apresentava mais límpido (Figura 12). À semelhança dos resultados obtidos, os autores Xing-qian et al. (2001) e Zhao et al. (2016), também estes obtiveram o mínimo de solubilidade, isto é, uma precipitação máxima da proteína, entre pH 4 e 5 de valor de pH.

Na Figura 12 está representado o aspeto visual dos sobrenadantes obtidos após a precipitação a diferentes pH e onde é evidenciado que a pH 3, 4 e 5 ocorre uma maior precipitação da proteínas dado que os sobrenadantes finais correspondentes apresentaram-se mais límpidos e com uma cor mais clara.

Figura 12 – Aspeto dos sobrenadantes e proteína resultante da precipitação a diferentes pH



Após escolha do pH para precipitação, procedeu-se a realização do processo de extração, com solubilização da proteína a 20 °C (P20) e a 50 °C (P50) e precipitação a pH 4 para determinação do rendimento de extração (Tabela 13). Não se obteve diferenças estatísticas nos rendimentos das duas condições testadas. Comparando os resultados da Tabela 13 com o rendimento obtido por outros autores, os valores foram iguais ou superiores, fator que poderá estar relacionado com as condições de extração usadas.

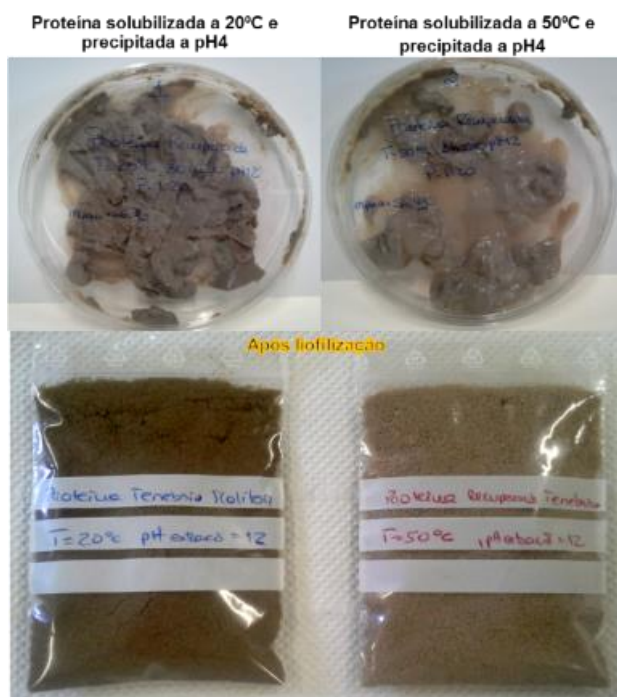
Tabela 13 – Rendimento obtido para o processo de extração da proteína de *Tenebrio molitor* após solubilização a 20 °C com 30 min de agitação e a 50 °C com 2h de agitação (n=6) e precipitação a pH 4.

P20	P50	Zhao et al. 2016 (a)	Yi et al. 2013 (b)
60,4% ± 7,4% ^a	54,9% ± 1,1% ^a	45,2 a 55,1%	32,6 a 39,4%

(a) para *Tenebrio molitor*, (b) para larvas de *Tenebrio molitor*, *Z. morio*, *A. Diaperinus* e indivíduos adultos de *A. domesticus* and *B. dúbia* e considerou-se a fração do pellet com sendo a proteína extraída. Os resultados do rendimento (%) correspondem à média ± desvio padrão. Valores com diferentes letras na mesma linha são significativamente diferentes ($p < 0.05$). Para a determinação das diferenças estatísticas entre duas condições, o teste t-student foi usado.

As proteínas extraídas após a solubilização a 20 °C com 30 min de agitação (P20) eram mais escuras do que as obtidas após solubilização a 50 °C com 120 min de agitação (P50) (Figura 13).

Figura 13 – Proteína (húmida e liofilizada) de *Tenebrio molitor* obtida após a solubilização a 20 °C com 30 min de agitação e a 50 °C com 120 min de agitação, seguida de precipitação a pH 4.



Observou-se que a proteína extraída de *Tenebrio molitor*, tal como aconteceu com as larvas, escurecia ao longo do tempo, principalmente a fração em contato com o ar. Este fenómeno poderá dever-se a um processo de formação da melanina existente nas larvas que co-precipita com as proteínas durante o processo de extração. Este escurecimento resulta num aspeto negativo para a aplicação destas proteínas num produto alimentar.

Alguns autores (Silva et al., 2016 e Lee et al., 2000) mencionam que a formação da melanina é um dos mecanismos de defesa primária (escurecimento da cutícula resultando num aumento da resistência contra agentes invasores e raios U.V.) e secundário (“sistema da pro-fenoloxidase” é ativado por componentes da parede celular, que oxidam o catecol e derivados em derivados de quinona que são convertidos em melanina) dos insetos.

Neste sentido, uma vez que este escurecimento provocado pela melanização também se verifica nos crustáceos (Sritunyalucksana & Soderhall, 2000), procedeu-se a um tratamento das larvas de *Tenebrio molitor*, à semelhança do que é feito no camarão. O tratamento foi efetuado com um agente antioxidante (ácido ascórbico) e um redutor (sulfito de sódio). Mergulharam-se as larvas de *Tenebrio molitor* numa solução de ácido ascórbico a 0,5% e sulfito de sódio (1,5 g/L), numa proporção de 1 kg de larvas para 1 L de solução e agitou-se durante 4 min. O tratamento demonstrou ser eficaz (Figura 14) e passou a ser aplicado.

Figura 14 – Resultados do tratamento efetuado às larvas de *Tenebrio molitor*, pela adição de ácido ascórbico e sulfito de sódio.



De seguida, procedeu-se à caracterização da proteína obtida antes e depois do tratamento, para avaliação das propriedades funcionais e reológicas.

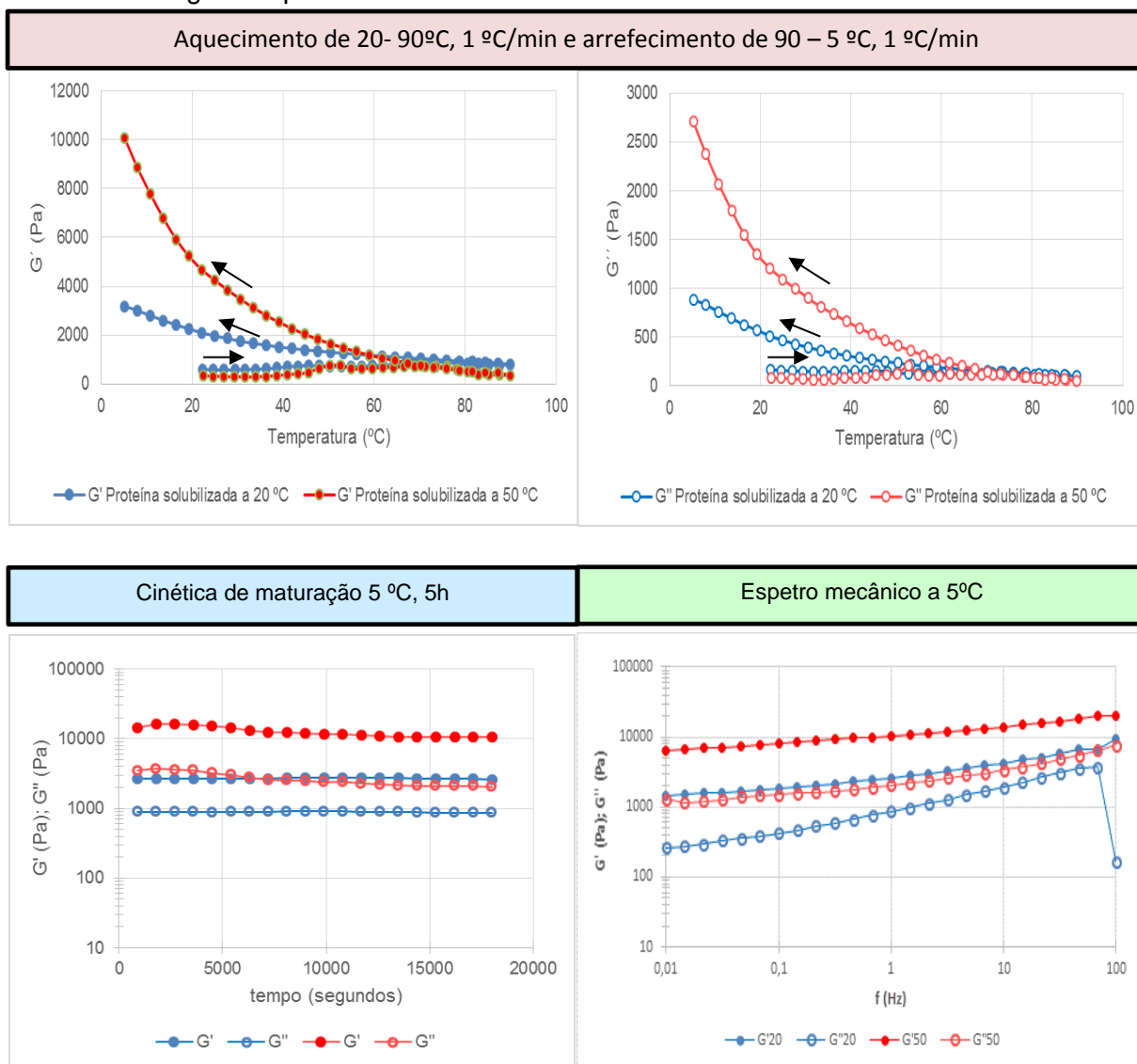
4.6 Propriedades Reológicas das proteínas extraídas de *Tenebrio molitor*

A caracterização reológica das proteínas solubilizadas a 20 °C (P20) e 50 °C (P50) e precipitadas a pH 4 encontra-se na seguinte figura.

Os valores numéricos apresentados na Figura 15 encontram-se no Anexo 1 e Anexo 2.

A curva de aquecimento da P20 apresenta um perfil semelhante à da P50. No decurso do arrefecimento ocorreu uma reorganização das moléculas devido à interação entre as proteínas, sendo que a P50 revelou-se mais sensível à temperatura, provavelmente por esta proteína estar mais desnaturada como consequência da temperatura usada no processo de extração. Também, verificou-se que a temperatura de gelificação foi diferente para ambas as proteínas. A gelificação, caracterizada pelo aumento repentino de G' , na P50 ocorreu por volta dos 67°C, ao passo que na P20 ocorreu aos 25 °C. Yi et al (2013) verificaram que uma solução de 15% de a proteína de *Tenebrio molitor* gelificava a por volta dos 62°C.

Figura 15 – Curvas de aquecimento e arrefecimento, cinética de maturação e espectro mecânico dos géis de proteína de *Tenebrio molitor* solubilizada a 20 °C e a 50 °C



Relativamente à maturação, observaram-se diferenças no comportamento dos géis formados pelas proteínas solubilizadas às diferentes temperaturas. Assim, o gel da P20 maturou quase instantaneamente, e o da P50 só após cerca de 4h se encontrava totalmente maturado. O

tempo de maturação é uma característica de grande interesse quando pretendermos aplicar estas proteínas em produtos alimentares que sofrem um processo de gelificação.

O espectro mecânico obtido demonstrou que, em ambas as proteínas, o módulo elástico (G') é sempre maior que o módulo viscoso (G'') e ambos os géis são dependentes da frequência. Uma vez que, ambos os módulos viscoelásticos foram superiores no gel formado pela P50, este gel considera-se mais estruturado que o obtido com a P20. De factos, os géis formados por proteínas recuperadas de subprodutos de pescada (Pires et al., 2012) eram mais fortes do que os géis obtidos com as proteínas de *Tenebrio molitor*. À semelhança da P20 e P50, o gel da proteína obtida de restos de pescada-do-Cabo no final do aquecimento já se encontravam maturados.

Relativamente aos valores obtidos por Zhao et al. (2016) para o extrato de proteína de *Tenebrio molitor*, a pH 7 numa concentração de 20%, o valor de G' inicial a 20 °C era cerca de 500 Pa, atingindo um máximo no final do arrefecimento (20 °C) de 870,8 Pa. Os valores iniciais de G' obtidos foram de 550 Pa para a proteína a 20 °C e de 320 Pa para a proteína a 50 °C mas, aumentaram, durante o arrefecimento, atingindo valores muito superiores (3100 Pa para a proteína a 20 °C e de 100000 Pa para a proteína a 50 °C). Em suma, os géis obtidos com a proteína de *Tenebrio molitor*, nas duas condições de extração, revelaram-se mais firmes que os géis obtidos por Zhao et al. (2016).

4.7 Caracterização e determinação das propriedades funcionais da proteína extraída de *Tenebrio molitor*

As proteínas, para além de serem uma fonte de aminoácidos essenciais, têm uma grande importância em termos tecnológicos devido à sua capacidade de interagirem com outros compostos (como polissacarídeos, lípidos ou moléculas de água). Adicionalmente, as suas propriedades funcionais poderão conferir aos alimentos no qual são incorporadas uma textura, corpo ou suculência desejada, mas também propriedades sensoriais (aspeto, cor e aromas) característicos. A conformação das proteínas e o tipo de interações que estabelecem com outros compostos contribuem para as propriedades mecânicas e físico-químicas que as proteínas apresentam. (Gomes de Castro, 2003).

Os vários parâmetros analisados para a caracterização da proteína extraída de *Tenebrio molitor* após solubilização a 20 °C e 50 °C, encontram-se na Tabela 14.

Na composição proximal, a P20 e P50 apresentaram teores de proteína e gordura de 10 a 12% e um valor de cinza relativamente baixo. Elas diferenciaram-se entre si no valor da % cinza e na % proteína. A diferença na % cinza poderá advir do fato de no decurso do processo de extração da proteína ser necessária maior quantidade de NaOH e HCl para o ajuste de pH quando este é efetuada a 50 °C. Quanto à % proteína, a diferença é justificada pelo fato da

%humidade da P50 ser inferior que, por um efeito de concentração, leva a que o valor de %proteína seja superior.

Os parâmetros da cor das duas proteínas consideram-se estatisticamente diferentes. A proteína P50 é mais branca e a cor é menos saturada que a P20 (ver Figura 13). Além disso, a proteína solubilizada a 50 °C apresentou valores de a^* e b^* mais elevados.

Tabela 14 – Composição proximal, parâmetros da cor e propriedades funcionais da P20 e P50.

Parâmetro		P20	P50	N
Composição química (%)	Humidade	$78,3 \pm 1,1^a$	$75,9 \pm 0,1^a$	3
	Cinza	$0,41 \pm 0,00^a$	$0,65 \pm 0,07^b$	
	Gordura ^(a) (em fresco)	$45,7 \pm 1,3^a$ ($9,9 \pm 0,3$)	$45,5 \pm 0,4^a$ ($11,0 \pm 0,1$)	
	Proteína	$10,9 \pm 0,2^a$	$11,5 \pm 0,1^b$	
Cor	L*	$66,661 \pm 0,160^a$	$72,621 \pm 0,220^b$	3
	a^*	$0,376 \pm 0,035^a$	$0,850 \pm 0,031^b$	
	b^*	$6,328 \pm 0,074^a$	$7,970 \pm 0,072^b$	
	W	$65,081 \pm 0,165^a$	$71,471 \pm 0,190^b$	
	C	$6,341 \pm 0,076^a$	$8,016 \pm 0,074^b$	
Índice de emulsificação (EAI) (m ² /g)		$3,70 \pm 0,61^a$	$5,07 \pm 0,32^b$	6
Capacidade de absorção de água (WAC) (ml/g)		$2,97 \pm 0,11^a$	$2,42 \pm 0,24^b$	9
Capacidade de absorção de gordura (FAC) (g/g)		$3,53 \pm 0,39^a$	$3,28 \pm 0,34^a$	12
Solubilidade proteica (%)		$5,78 \pm 0,53^a$	$8,54 \pm 0,69^b$	3
Capacidade formação de espuma (FC) (%)		$6,0 \pm 0,7^a$	$6,3 \pm 1,6^a$	6
Estabilidade da espuma (FS) (%)		$99,5 \pm 0,5^a$	$98,4 \pm 1,2^a$	6

Valores com diferentes letras na mesma linha são significativamente diferentes ($p < 0.05$). Os resultados correspondem à média \pm desvio padrão. Para a determinação das diferenças estatísticas entre duas condições, o teste de Fisher foi usado para avaliar a homogeneidade de variâncias, seguido do teste t-student. (a) Valor obtido para a proteína liofilizada.

De uma forma geral, as proteínas extraída de *Tenebrio molitor* apresentaram um baixo valor de solubilidade de proteínas, de WAC e de formação de espuma. No entanto, a espuma formada por estas proteínas revelou-se bastante estável. Pelo contrário, os valores obtidos para o FAC foram relativamente altos e o de EAI considerou-se um valor médio comparativamente com proteínas de outras fontes.

Os valores do EAI e da solubilidade proteica da P50 foram superiores aos da P20. Pelo contrário, a P20 apresentou a maior capacidade de absorção de água. A capacidade de emulsificação das proteínas depende da solubilidade, da elevada hidrofobicidade superficial, grau de hidratação, entre outros fatores (Gomes de Castro, 2003). Apesar da P50 ter

apresentado um FAC semelhante à P20, o fato de ter apresentado uma maior solubilidade (maior número de grupos hidrofílicos para interagir com a água) e de estar mais desnaturada (um maior número de grupos hidrofóbicos à superfície) fez com que tenha maior capacidade de formar emulsões por conseguir interagir com as duas fases (água e óleo). Este fato foi confirmado pelo maior valor de EAI obtido.

Tabela 15 – Propriedades funcionais de proteínas de diferentes fontes obtidas por vários autores.

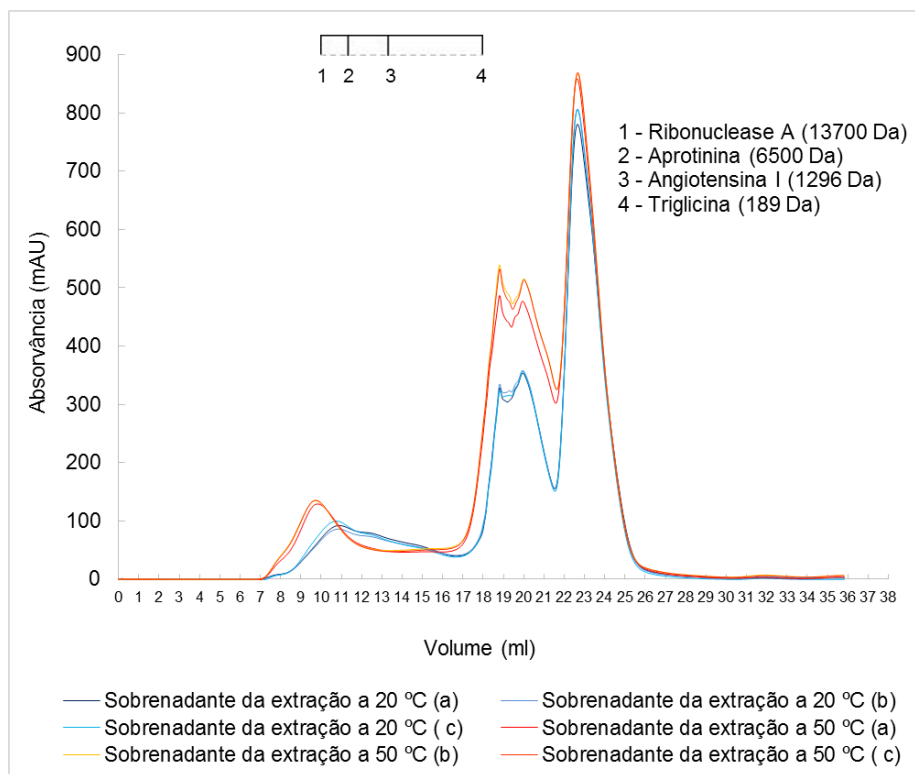
Parâmetro	Zhao et al. 2016 (<i>Tenebrio molitor</i>)	Pires et al. 2012 (subprodutos pescada)	Pires et al. 2012 (Soja)	Pires et al. 2012 (Clara de ovo)	Sathivel et al. 2005 (hidrolisados de salmão)	Moure et al. 2006 (Concentrados e isolados comerciais de Soja)
Índice de emulsificação (EAI) (m ² /g)	---	2,03	7,39	5,18	---	---
Capacidade de absorção de água (WAC) (ml/g)	1,87	---	---	---	1,7 a 3,3	1,96 a 8,56
Capacidade de absorção de gordura (FAC) (g/g)	2,33	4,67	3,18	2,91	---	0,92 a 2,51
Solubilidade proteica (%)	---	4,63	2,10	94,60	17,2 a 54,4	2,3 a 71,1
Capacidade formação de espuma (FC) (ml espuma/g proteína)	---	2,78	2,17	7,55	---	---
Estabilidade da espuma (FS) (%)	---	100,0	97,6	98,6	66,9 a 100	---

Os resultados das propriedades funcionais das proteínas extraídas de *Tenebrio molitor* situavam-se na gama de valores encontrados para proteínas analisadas por outros autores (Tabela 15). No entanto, a WAC e a FAC são superiores aos valores obtidos por Zhao et al. 2016 para proteínas extraídas de *Tenebrio molitor*. Além disso, estas proteínas apresentavam maior EAI que as proteínas extraídas a partir de subprodutos de pescada-do-Cabo mas, menor do que as proteínas de soja e clara de ovo.

Os valores de solubilidade proteica e FAC obtidos para as proteínas em estudo, foram superiores aos valores reportados para proteínas extraídas da pescada e para proteínas de soja mas, foram inferiores aos reportados para a clara de ovo. As proteínas de soja e a clara de ovo apresentavam valores de estabilidade de espuma semelhantes aos das proteínas de *Tenebrio molitor*.

Na figura seguinte, está representado o perfil por filtração gel para os sobrenadantes finais obtidos após solubilização a 20 °C e a 50 °C e precipitação a pH 4.

Figura 16 – Perfil por filtração gel das proteínas dos sobrenadantes de *Tenebrio molitor* resultantes da solubilização a 20 °C e a 50 °C.



Como se pode verificar as proteínas que permaneceram nos sobrenadantes nas duas condições apresentavam perfis semelhantes, No entanto, o primeiro pico obtido na condição de solubilização a 50 °C era mais acentuado e apareceu mais cedo, indicando a presença de proteínas de maior peso molecular. Estas moléculas poderão ser agregados proteicos resultantes da desnaturação da proteína durante a etapa de solubilização e que não precipitaram após o ajuste do pH.

No que diz respeito ao teor de aminoácidos (Tabela 16) observou-se que, comparativamente com as larvas, a P20 e P50 apresentaram uma diminuição significativa dos teores dos aminoácidos histidina, glicina, valina e prolina. Para além disso, a P50 apresentou uma diminuição significativa dos teores de serina, treonina, arginina, fenilalanina, lisina, ao passo que na P20 os valores não são estatisticamente diferentes dos das larvas. Mediante análise dos resultados, pode-se dizer que, durante a solubilização a 50 °C, houve maiores perdas de alguns aminoácidos, ficando estes provavelmente na fração aquosa aquando da precipitação da proteína a pH 4 ou na fração insolúvel durante o processo de solubilização

Os teores de aminoácidos das proteínas extraídas por solubilização a 20 °C e 50 °C foram inferiores aos referidos por Zhao et al. (2016), à exceção do teor de ácido aspártico na P20.

Tabela 16 - Teor de aminoácidos (g/100g proteína) das proteínas extraídas de *Tenebrio molitor* por solubilização a 20 °C e 50 °C (n=3).

	Larvas <i>Tenebrio molitor</i>	Proteína extraída com solubilização a 20°C	Proteína extraída com solubilização a 50°C	Zhao et al. 2016 ^(c)
Ácido aspártico (ASP)	7,42 ± 0,27 ^a	9,69 ± 0,02 ^c	8,70 ± 0,36 ^b	9,33 ^(a)
Ácido glutâmico (GLU)	9,55 ± 0,36 ^b	10,49 ± 0,02 ^c	9,16 ± 0,43 ^b	12,88 ^(b)
Asparagina (ASN)	<LQ	<LQ	<LQ	---
Serina (SER)	4,43 ± 0,16 ^b	4,14 ± 0,02 ^{ab}	3,90 ± 0,18 ^a	4,02
Glutamina (GLN)	<LQ	<LQ	<LQ	---
Histidina (HIS)	2,20 ± 0,09 ^b	1,62 ± 0,04 ^a	1,68 ± 0,06 ^a	2,41
Glicina (GLY)	5,03 ± 0,16 ^b	4,44 ± 0,03 ^a	4,39 ± 0,19 ^a	5,29
Treonina (THR)	4,18 ± 0,15 ^b	4,49 ± 0,04 ^b	3,63 ± 0,18 ^a	3,65
Arginina (ARG)	3,47 ± 0,16 ^b	3,59 ± 0,03 ^b	2,70 ± 0,09 ^a	5,55
Alanina (ALA)	7,69 ± 0,19 ^c	4,72 ± 0,02 ^a	5,32 ± 0,23 ^b	6,98
Tirosina (TYR)	5,12 ± 0,16 ^a	5,80 ± 0,01 ^b	5,52 ± 0,24 ^b	---
Cisteína (CYS)	<LQ	<LQ	<LQ	---
Valina (VAL)	3,75 ± 0,12 ^b	2,63 ± 0,02 ^a	2,70 ± 0,14 ^a	6,56
Metionina (MET)	<LQ	<LQ	<LQ	---
Triptofano (TRP)	<LQ	0,45 ± 0,02 ^b	0,36 ± 0,01 ^a	---
Fenilalanina (PHE)	2,62 ± 0,12 ^a	3,22 ± 0,01 ^c	2,90 ± 0,13 ^b	---
Isoleucina (ILE)	2,44 ± 0,09 ^b	2,09 ± 0,01 ^a	2,10 ± 0,10 ^a	5,07
Leucina (LEU)	5,78 ± 0,18 ^a	6,04 ± 0,04 ^a	5,87 ± 0,27 ^a	8,30
Lisina (LYS)	1,99 ± 0,11 ^b	2,17 ± 0,25 ^b	1,46 ± 0,14 ^a	5,90
Prolina (PRO)	7,30 ± 0,20 ^b	3,96 ± 0,06 ^a	4,19 ± 0,17 ^a	4,85
MET+CYS	<LQ	<LQ	<LQ	2,13
PHE+TYR	7,74 ± 0,26 ^c	9,01 ± 0,02 ^a	8,42 ± 0,37 ^b	10,91
Total de AA	72,97 ± 2,15 ^b	69,55 ± 0,18 ^b	64,56 ± 2,85 ^a	94,02
Total de a.a. essenciais	28,08 ± 0,91 ^{ab}	28,51 ± 0,24 ^b	26,21 ± 1,22 ^a	44,93

Nota: Os valores representam a média ± desvio padrão e quando assinalados com diferentes letras na mesma linha são significativamente diferentes (p<0.05). O modelo linear da Anova unidirecional foi utilizado para determinar diferenças estatísticas para o mesmo aminoácido, seguido por um teste de comparação múltipla (Tukey HSD). (a) o autor refere este valor como pertencente ao ácido aspártico ou asparagina; (b) o autor refere este valor como pertencente ao ácido glutâmico ou glutamina. (c) Valores convertidos de g/kg de proteína para g/100g de massa de proteína de *Tenebrio molitor* usando a média da %proteína dos vários extratos (50,58%) obtida pelo autor.

4.8 Eletroforese SDS-PAGE

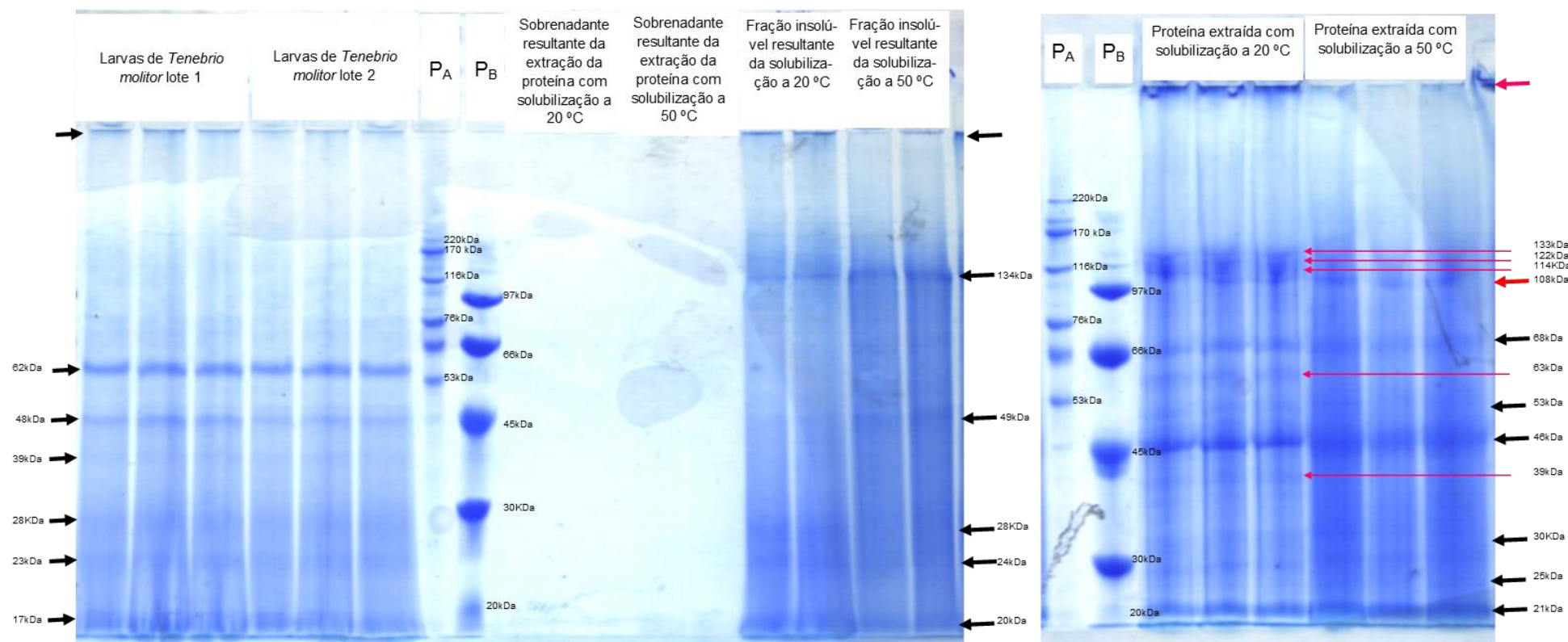
Os perfis das proteínas das várias frações (proteínas extraídas, resíduo resultante da solubilização e sobrenadante resultante da precipitação) resultantes do processo de extração

das proteínas a 20 °C e a 50 °C, e das larvas de *Tenebrio molitor*, foram determinados por eletroforese SDS-PAGE e os resultados estão apresentados na Figura 17.

A fração proteica das larvas de *Tenebrio molitor* era constituída por proteínas com pesos molecular de 17, 23, 28, 48, 62 kDa, existindo ainda uma fração que ficava no ponto de aplicação. Nos sobrenadantes não foram detetadas bandas, possivelmente porque o método de coloração do gel não é suficientemente sensível para a concentração e proteína aplicada. Verificou-se também que, na fração insolúvel, permaneceram ainda algumas proteínas, e por isso uma fração não foi solubilizada a pH 12. Para além de proteínas com um peso molecular elevado, existiam proteínas com peso molecular de 134 kDa, que não existiam inicialmente nas larvas. Estas proteínas poderão resultar da hidrólise no decurso da solubilização por ação enzimática. As proteínas de peso molecular entre 134 e 20 kDa poderão ter origem na ação destas enzimas sobre as proteínas de maior peso molecular ou poderão ser resultados da sua não solubilização, dado serem frações em menor concentração.

Relativamente à proteína extraída após solubilização a 20 °C, esta apresentou mais proteínas com diferentes pesos moleculares (12 frações no total), comparativamente com a proteína extraída após solubilização a 50 °C (7 frações no total). Para ambas as condições verificou-se alguma hidrólise das proteínas, uma vez que, surgiram proteínas com pesos moleculares menores (133, 122, 108, 114, 68, 39 e 30 kDa) que não se encontravam nas amostras de larvas de *Tenebrio molitor*. Pelo fato de a proteína extraída após solubilização a 50 °C ter apresentado menor número frações e estas terem pesos moleculares inferiores comparativamente com a proteína extraída após solubilização a 20 °C, compreende-se que houve uma maior hidrólise das proteínas na primeira (a 50 °C), e, conseqüentemente, apresentava maior número de péptidos.

Figura 17 – Imagem do gel de eletroforese obtido para as diferentes frações resultantes do processo de extração da proteína de *Tenebrio molitor* em duas condições de solubilização (20 °C e 50 °C).



Nota: as setas a rosa correspondem às frações que surgem apenas na proteína extraída após solubilização a 20 °C; as setas a vermelho correspondem às frações que surgem apenas na proteína extraída após solubilização a 50 °C; as setas a preto são as frações comuns a ambas.

Na tabela seguinte estão apresentadas os diferentes tipos de proteínas de larvas de *Tenebrio molitor* identificadas por diferentes autores.

Tabela 17 – Proteínas e respetivos pesos moleculares, identificadas por vários autores

Peso molecular (kDa)	Identificação	Autores
23	Proteínase do género da quimiotripsina	Elpidina et al. 2005
43	Proteínas de inibição da melanização	Zhao et al. 2005 ^J citado por Yi et al. 2013
59	Proteína β -glicosidase	Ferreira et al. 2001
86	Proteínas relacionadas com a encapsulação	Cho et al. 1999
160	Proteínas tipo vitelogeninas	Lee et al. 2000
400	Proteínas da linha M dos sarcómeros das miofibras do músculo das asas e pernas	Bullar & Leonoard, 1996
500	Proteínas da linha Z dos sarcómeros das miofibras do músculo das pernas	

Yi et al. (2013) detetaram uma banda com um peso molecular ≤ 14 kDa que consideraram ser de proteínas tipo anti-congelação. Neste trabalho estas proteínas não foram identificadas. As proteínas com peso molecular entre 14 e 32 kDa são as pertencentes à cutícula de acordo com Anderson et al. (1995) e nos resultados deste estudo obteve-se duas bandas nesta gama, uma a 23 kDa correspondente a proteínas tipo quimiotripsina e a 28 kDa. As proteínas que ficavam no ponto de aplicação devem corresponder às proteínas das unidades das miofibrilas de elevado peso molecular e por conseguinte não entraram no gel. À semelhança dos resultados obtidos por Li et al. 2013, a maioria das bandas obtidas nas larvas de *Tenebrio molitor* encontravam-se na região entre 30 e 95 kDa.

4.9 Justificação da escolha da metodologia a ser usada na extração das proteínas de *Tenebrio molitor*.

Tendo em conta os resultados apresentados nos pontos 4.6, 4.7 e 4.8, selecionou-se para a extração das proteínas de *Tenebrio molitor*, a solubilização das proteínas a pH 12 à temperatura de 20 °C, proporção larva:água de 1:20 com agitação de 30 min. Após separação da fração insolúvel por centrifugação a 9100rpm, 20 min a 4 °C, procedeu-se à precipitação da proteína a pH 4. A proteína precipitada foi separada por centrifugação a 9100rpm, 20 min a 4 °C, sendo de seguida congelada a -20 °C para posterior liofilização.

^J Zhao, M., Soderhall, I., Park, J. W., Ma, Y. G., Osaki, T., Ha, N. C., et al. (2005). A novel 43-kDa protein as a negative regulatory component of phenoloxidase-induced melanin synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (26), 24744-24751.

Esta seleção baseou-se nos seguintes fatos:

1º - O processo de extração ser mais rápido e economicamente mais rentável para a aplicação industrial, dado que não necessita de um aquecimento a uma temperatura relativamente alta como a 50°C;

2º - Apesar de a 50 °C a solubilização ter um rendimento superior, após precipitação da proteína os resultados obtidos não são significativamente diferentes dos obtidos quando a solubilização é feita a 20°C;

3º - Os resultados obtidos pela análise reológica, filtração gel e eletroforese demonstraram que a proteína extraída de *Tenebrio molitor* após solubilização a 50 °C encontrava-se mais desnaturada e, o processo de extração a esta temperatura resultou numa maior hidrólise da proteína;

4º - Em termos de propriedades funcionais, as proteínas obtidas por solubilização a 20 e a 50 °C não diferem muito com exceção, do índice de emulsificação (EAI) e da solubilidade proteica que é maior para a segunda condição (50°C) e da capacidade de absorção de água (WAC) que é maior para a primeira (20 °C).

5º - Em termos de aminoácidos, no processo de solubilização a 50 °C ocorre uma maior perda de aminoácidos.

4.10 Análise sensorial

Numa primeira fase, tentou-se fazer um biscoito com as proteínas extraídas de *Tenebrio molitor*, por solubilização a 20 °C (P20) e a 50 °C (P50) e precipitação a pH 4, usando uma receita sem ovo. Com este ensaio pretendia-se avaliar se a receita utilizada daria origem a um produto aceitável, isto é, a um produto que o painel de provadores gostasse independentemente da concentração de proteína de *Tenebrio molitor* utilizada. Numa segunda fase, tentou-se fazer uma bolacha utilizando uma receita tradicional de bolachas de manteiga onde se incorporaram diferentes percentagens das proteínas extraídas de *Tenebrio molitor*.

Os resultados da avaliação sensorial dos biscoitos preparados com proteína de *Tenebrio molitor* estão apresentados no Figura 18 e Figura 19 e os valores numéricos no Anexo 5. Os resultados desta primeira prova sensorial demonstraram que os biscoitos preparados não tiveram uma grande aceitação em termos de textura. Os biscoitos com proteína solubilizada a 50 °C em, apresentaram uma menor percentagem no índice de aceitação para o parâmetro avaliação global que os produzidos com proteína extraída a 20 °C. Alguns elementos do painel detetaram um sabor amargo/picante/adstringente nos biscoitos com proteína de *Tenebrio molitor* e classificaram-nos como secos e quebradiços e com sabor “enfarinhado”.

Figura 18 - Índice de aceitação dos diferentes parâmetros avaliados nos biscoitos

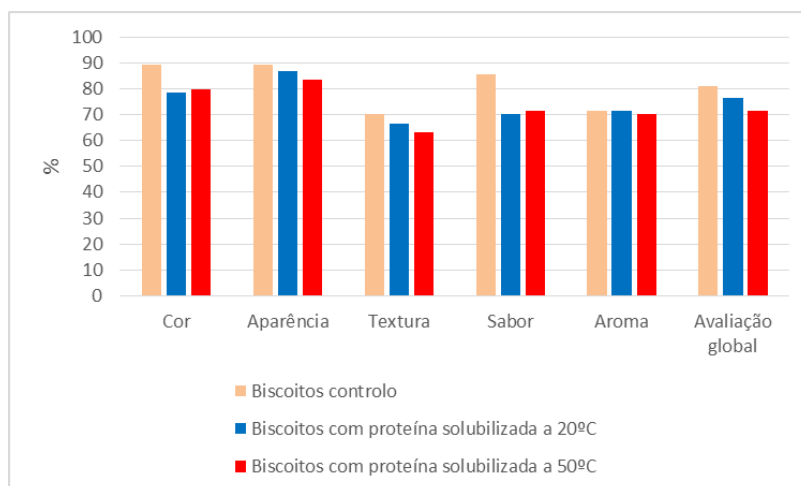
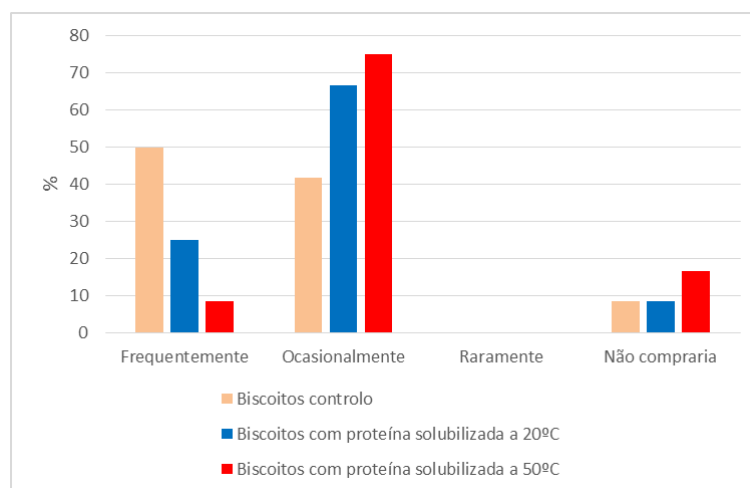


Figura 19 - Intenção de comprar os diferentes biscoitos



Pelo fato dos biscoitos controlo terem uma intenção de não compra acima dos 5% e pelas observações negativas mencionadas sobre a textura e sabor, alterou-se a receita para uma receita de bolachas de manteiga.

Na Figura 20 e Figura 21 estão apresentados os resultados da análise sensorial das bolachas de manteiga onde foram incorporadas diferentes % de proteína extraída de *Tenebrio molitor* extraída a 20 °C e no Anexo 6 e Anexo 7 estão apresentados os valores numéricos. No 1º ensaio, na maioria dos atributos avaliados, as bolachas com 4% de proteína obtiveram uma classificação semelhante ou superior à bolacha controlo (Figura 20). No 2º ensaio, as bolachas controlo sobressaíram em termos de cor e aparência mas, em termos de crocância, sabor e aroma, as bolachas com 8% proteína apresentaram maior índice de aceitação (Figura 20).

Analisando os resultados da avaliação global das diferentes bolachas em função da faixa etária dos provadores (Figura 21) observa-se que, as faixas etárias mais novas apreciaram mais as bolachas com maiores percentagens de proteína e que as bolachas preparadas com

as larvas de *Tenebrio molitor* foram as que tiveram pior índice de aceitação. Observa-se também que, na maioria do painel, o índice de aceitação das bolachas com proteína de *Tenebrio molitor*, para a avaliação global encontravam-se acima dos 80%, à exceção das bolachas com 8% de proteína na faixa dos 40-49.

Figura 20 - Índice de aceitação dos diferentes parâmetros avaliados nas bolachas com 4% de larvas, 2%, 4% de proteína (1ºensaio) e 8% de proteína (2ºensaio) de *Tenebrio molitor* sem e com especiarias

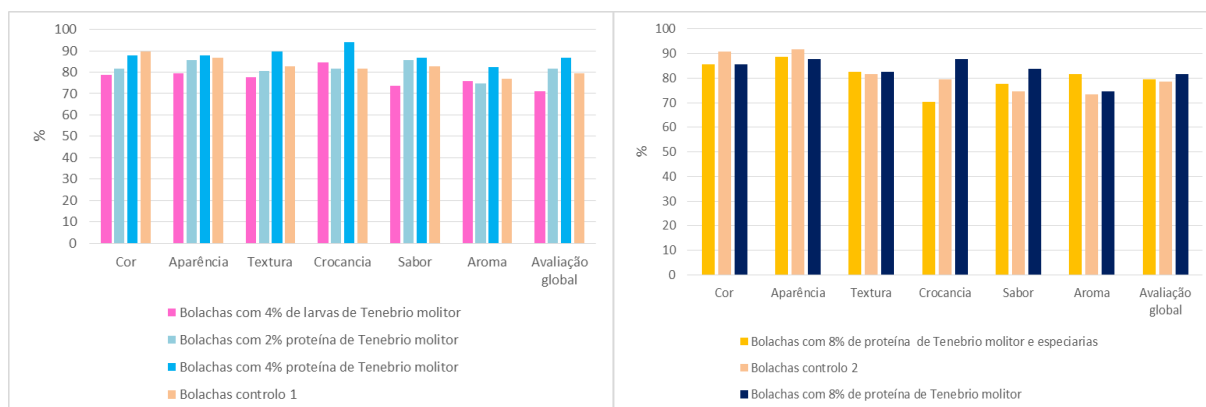
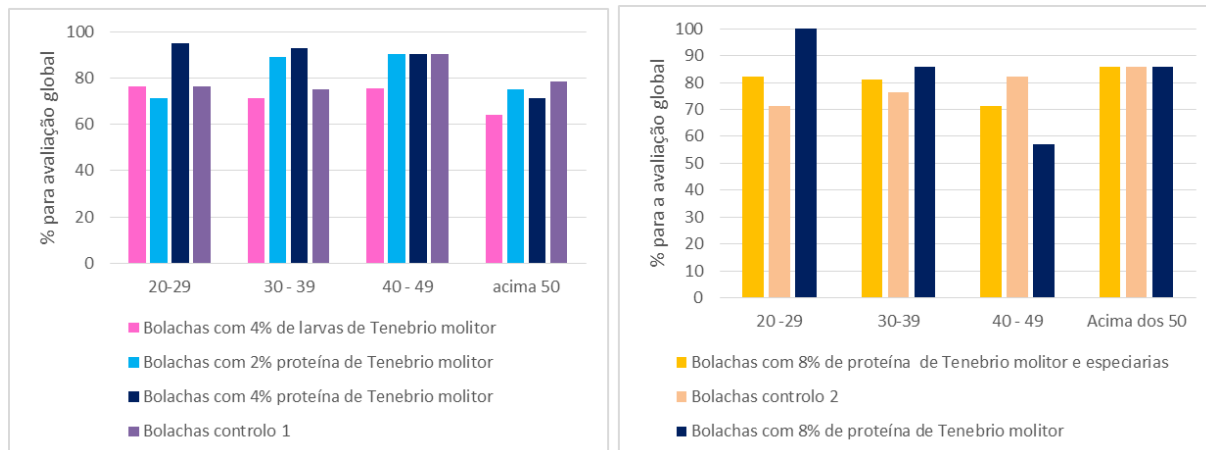
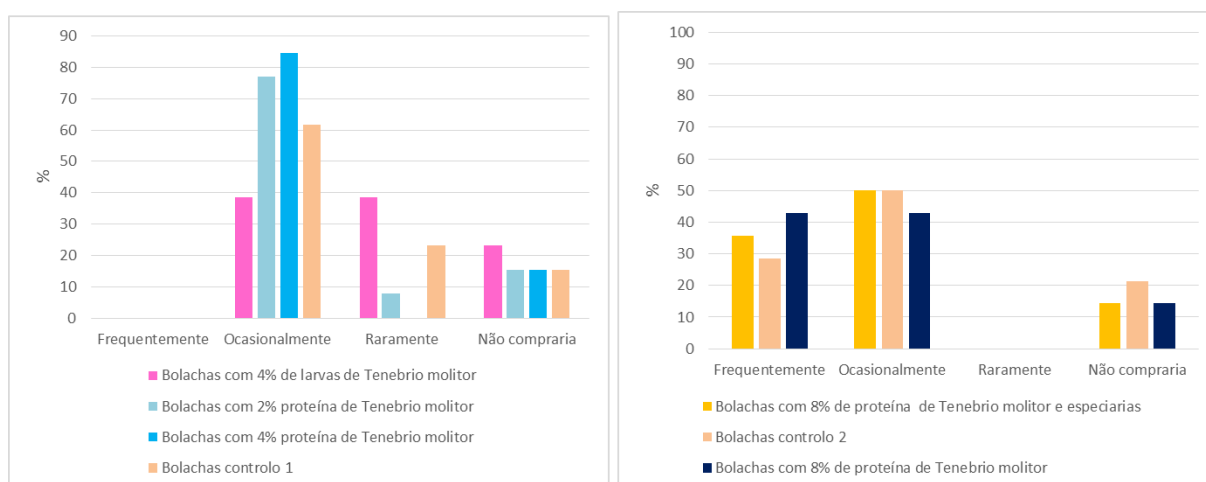


Figura 21 - Índice de aceitação global por faixa etária nas bolachas com 4% de larvas, 2, 4 de proteína (1ºensaio) e 8% de proteína (2ºensaio) de *Tenebrio molitor* sem e com especiarias.



Em termos de intenção de compra, no 2ºensaio obteve-se uma melhoria dos resultados em relação à avaliação obtida para as bolachas do 1º ensaio. Os elementos do painel demonstraram uma boa aceitação das bolachas preparadas com as diferentes percentagens de proteína de *Tenebrio molitor*.

Figura 22 - Intenção de compra das bolachas com 4% de larvas, 2, 4% de proteína (1º ensaio) e 8% de proteína (2º ensaio) de *Tenebrio molitor* com e sem especiarias.



É de salientar, que teria sido possível obter uma melhoria de alguns dos atributos como por exemplo a textura, cor e sabor através da adição de alguns aditivos (emulsionantes, aromatizantes ou corantes) e até mesmos através da realização de alguns ajustes na receita das bolachas.

4.11 Produção de salsichas tipo Frankfurt com proteínas extraídas de *Tenebrio molitor*.

Neste trabalho, procedeu-se também à preparação de salsichas tipo Frankfurt incorporando 50% da proteína de *Tenebrio molitor* obtida após solubilizada a 20 °C e a 50 °C e precipitação a pH 4. Após a cozedura as salsichas apresentavam uma consistência pastosa (Figura 23), não característica deste tipo de produto. Devido ao prazo de entrega da tese não foi possível proceder à otimização da receita de salsichas, de forma a obter uma consistência aceitável, para posterior caracterização nutricional e organolética do produto.

Figura 23 - Aspeto das salsichas preparadas com 50% da proteína de *Tenebrio molitor* obtida após solubilização a 20 °C e a 50 °C.



4.12 Caracterização das bolachas com proteína de *Tenebrio molitor*

Não foi realizada a determinação da composição química dos biscoitos uma vez que, a maioria do painel achou que o produto era muito seco e que não apreciaram a sua textura.

Para a composição proximal das bolachas preparadas com diferentes percentagens de proteína de *Tenebrio molitor* extraídas a 20° C, foi efetuado um pool de 15 bolachas e os resultados estão apresentados na Tabela 18. Para a determinação da cor e da textura das bolachas foram analisadas 15 bolachas estando os resultados da cor na Tabela 19 e os resultados das dimensões e dureza na Tabela 20.

Tabela 18 – Composição proximal das bolachas com 4% de larvas e com 2%, 4% e 8 % (m/m) de proteína extraída de *Tenebrio molitor*.

		%Humidade (n=3)	%Cinza (n=3)	%Proteína (n=3)	%Gordura (n=3)	%Hidratos de carbono
1º ensaio	Bolachas Controlo 1	6,95 ± 0,06 ^e	2,13 ± 0,00 ^e	10,49 ± 0,89 ^b	20,28 ± 0,32 ^a	60,15
	Bolachas com 4% de larvas	5,99 ± 0,03 ^c	2,25 ± 0,00 ^f	12,20 ± 0,53 ^d	20,78 ± 0,68 ^{ab}	58,78
	Bolachas com 2% de proteína	3,93 ± 0,11 ^a	2,03 ± 0,01 ^d	11,05 ± 0,43 ^c	21,69 ± 0,35 ^{bc}	61,30
	Bolachas com 4% de Proteína	6,72 ± 0,00 ^d	1,84 ± 0,00 ^b	12,02 ± 0,25 ^d	22,09 ± 0,07 ^{cd}	57,33
2º ensaio	Bolachas Controlo 2	8,06 ± 0,02 ^f	1,73 ± 0,00 ^a	9,64 ± 1,63 ^a	20,58 ± 0,16 ^a	59,98
	Bolachas com 8% de proteína	4,20 ± 0,07 ^b	1,99 ± 0,01 ^c	13,40 ± 0,42 ^f	23,65 ± 0,09 ^e	56,51
	Bolachas com especiarias e 8% de proteína	6,87 ± 0,03 ^{de}	1,98 ± 0,02 ^c	12,92 ± 0,08 ^e	22,67 ± 0,21 ^{de}	55,57

Nota: A % de hidratos de carbono foi calculada por diferença. Os resultados da % dos diferentes parâmetros correspondem à média ± desvio padrão. Valores com diferentes letras na mesma coluna, são significativamente diferentes (p<0.05). O modelo linear da Anova unidirecional foi utilizado para determinar diferenças estatísticas (por coluna) entre várias condições, seguido por um teste de comparação múltipla (Tukey HSD).

A adição de proteína de *Tenebrio molitor* levou a um aumento significativo da percentagem da proteína e de gordura, de 1% a 2% no 1º ensaio e no 2º ensaio de 3% a 4% e 2 a 3%, respetivamente, havendo assim um enriquecimento em termos nutricionais do produto.

Relativamente à humidade, existe uma grande variabilidade entre as diferentes amostras, não havendo nenhuma correlação do aumento da percentagem da humidade com o aumento da percentagem de proteína adicionada. As diferenças entre as duas bolachas controlo, em termos de percentagem de humidade, foram consequência dos diferentes tempos de cozedura (1º ensaio o tempo de cozedura foi de 15 min e no 2º ensaio foi de 10 min), o que condicionou os restantes parâmetros da composição química. O fato das bolachas com 8% de proteína apresentarem diferentes teores de humidade, bem como, o teor de humidade das

bolachas com 2% proteína ter sido muito inferior ao controlo, poderá ter origem na grande variabilidade no diâmetro e espessura das mesmas (Tabela 20).

O aumento da quantidade de proteína adicionada foi acompanhado de um aumento do valor de proteína e gordura obtido na bolacha. A adição de 4% de larvas trouxe o mesmo apor em termos proteicos que a adição de 4% de proteína extraída. No entanto, a fração de gordura que provém da adição das larvas é menor que a que provém da adição da proteína. O fato das bolachas com 8% de proteína extraída apresentarem valores sempre superiores às com 8% de proteína extraída e com especiarias, poderá dever-se a uma ligeira diluição (em termos de concentração em massa) com a adição das especiarias e ao valor de humidade ser inferior o que origina uma concentração das proteínas e gordura.

Tabela 19 – Parâmetros da cor das bolachas com 4% de larvas e com 2 %, 4 % e 8 % (m/m) de proteína extraída de *Tenebrio molitor*

		Parâmetros da Cor (n=15)				
		L* (+)	a*	b* (+)	W (+)	C
1º ensaio	Bolachas Controlo 1	62,188 ± 1,168 ^b	7,300 ± 0,14 ^a	25,102 ± 0,383 ^c	54,024 ± 0,852 ^{abc}	26,142 ± 0,396 ^f
	Bolachas com 4% de larvas	57,190 ± 0,348 ^{ab}	9,248 ± 0,158 ^e	23,066 ± 0,107 ^{bc}	50,500 ± 0,363 ^{ab}	24,851 ± 0,151 ^e
	Bolachas com 2% de proteína	55,050 ± 0,145 ^a	9,430 ± 0,137 ^e	22,428 ± 0,104 ^{abc}	48,888 ± 0,181 ^a	24,330 ± 0,137 ^e
	Bolachas com 4% de Proteína	61,482 ± 0,229 ^{ab}	6,070 ± 0,083 ^b	21,334 ± 0,342 ^{abc}	55,551 ± 0,306 ^{bc}	22,181 ± 0,342 ^d
2º ensaio	Bolachas Controlo 2	63,978 ± 0,029 ^b	5,050 ± 0,060 ^a	20,756 ± 0,175 ^{ab}	58,120 ± 0,100 ^c	21,362 ± 0,175 ^c
	Bolachas com 8% de proteína	55,084 ± 0,611 ^a	8,270 ± 0,197 ^d	18,266 ± 0,633 ^a	50,810 ± 0,805 ^{ab}	20,051 ± 0,652 ^b
	Bolachas com especiarias e 8% de proteína	57,558 ± 0,444 ^{ab}	7,372 ± 0,151 ^c	17,092 ± 0,478 ^a	53,655 ± 0,587 ^{abc}	18,614 ± 0,494 ^a

Os resultados correspondem à média ± desvio padrão e quando assinalados com diferentes letras na mesma coluna, são significativamente diferentes (p<0.05). O modelo linear da Anova unidirecional foi utilizado para determinar diferenças estatísticas (por coluna), seguido por um teste de comparação múltipla (Tukey HSD). Quando os dados não satisfizeram os requisitos, as diferenças foram analisadas com uma análise de variância não paramétrica (Kruskal–Wallis) (parâmetro assinada com (+)) seguido do teste de comparação múltipla (Mann–Whitney).

Na preparação das bolachas foi adicionada linhaça castanha para atenuar visualmente a cor escura resultante da adição da proteína e larvas de *Tenebrio molitor*. No entanto, apesar de visualmente o painel não ter detetado diferenças entre as bolachas controlo e aquelas nas quais se incorporou proteína e larvas de *Tenebrio molitor*, observou-se uma alteração dos parâmetros da cor. O valor de L* diminui significativamente com a adição de 2% e 8% proteína relativamente aos valores das bolachas controlo, tendo esta diminuição sido atenuada pela adição de especiarias. Já no valor de b* não se observou diferenças relativamente aos respetivos controlos. Observou-se um aumento do valor de a* com a adição da proteína (excetuando para as bolachas com 4% de proteína) e portanto as bolachas passam a ter um

tom mais avermelhado, sendo que a adição das especiarias atenua esse aumento. Também se verificaram diferenças significativas no valor de C das diferentes amostras, observou-se uma diminuição deste valor com o aumento da quantidade de proteína, que se traduziu numa diminuição da saturação da cor. Para o valor da brancura, apenas as bolachas com 4 e 8% de proteína apresentaram diferenças relativamente aos respetivos controlos, no entanto, não se observou uma correlação com o aumento da concentração da proteína adicionada. De fato, nos resultados não é evidente nenhuma tendência de diminuição do valor de L* e W.

Tabela 20 - Dimensões, dureza e fraturabilidade das bolachas (n=15) com 4% de larvas e com 2%, 4% e 8 % (m/m) de proteína extraída de *Tenebrio molitor*

		Espessura (cm) (+)	Variabilidade da espessura (a)	Diâmetro (cm) (+)	Variabilidade do diâmetro ^a	Fator de expansão	Dureza (N)
1º ensaio	Bolachas Controlo 1	1,18 ±0,04 ^{ab}	0,05 ±0,05	6,57 ±0,12 ^{bc}	0,15 ±0,07	5,58 ±0,18 ^{abc}	4,60 ±0,73 ^b
	Bolachas com 4% de larvas	1,03 ±0,10 ^a	0,09 ±0,04	6,33 ±0,22 ^{ab}	0,09 ±0,05	5,89 ±0,55 ^c	8,86 ±1,41 ^d
	Bolachas com 2% de proteína	1,06 ±0,15 ^a	0,06 ±0,04	6,42 ±0,14 ^{ab}	0,07 ±0,06	6,15 ±0,76 ^{bc}	8,91 ± 1,49 ^d
	Bolachas com 4% de Proteína	1,14 ±0,12 ^{ab}	0,05 ±0,04	6,67 ±0,16 ^c	0,09 ±0,05	5,89 ±0,55 ^{bc}	2,99 ±0,55 ^a
2º ensaio	Bolachas Controlo 2	1,24 ±0,09 ^b	0,05 ±0,03	6,89 ±0,34 ^c	0,15 ±0,18	5,44 ±0,36 ^{ab}	3,04 ±0,91 ^a
	Bolachas com 8% de proteína	1,07 ±0,14 ^a	0,07 ±0,08	6,20 ±0,16 ^a	0,11 ±0,13	5,74 ±0,79 ^{abc}	14,58 ± 2,37 ^e
	Bolachas com especiarias e 8% de proteína	1,20 ±0,13 ^{ab}	0,06 ±0,05	6,21 ±0,20 ^a	0,14 ±0,11	5,15 ±0,50 ^a	6,08 ± 1,33 ^c

(a) – dentro da mesma bolacha. Os resultados correspondem à média ± desvio padrão e quando assinalados com diferentes letras na mesma coluna, são significativamente diferentes (p<0.05). O modelo linear da Anova unidirecional foi utilizado para determinar diferenças estatísticas (por coluna), seguido por um teste de comparação múltipla (Tukey HSD). Quando os dados não satisfizeram os requisitos, as diferenças foram analisadas com uma análise de variância não paramétrica (Kruskal–Wallis) (parâmetro assinada com (+)) seguido do teste de comparação múltipla (Mann–Whitney).

No que diz respeito à espessura das bolachas, nos dois ensaios, as bolachas preparadas com as larvas e proteínas de *Tenebrio molitor* eram idênticas às bolachas controlos com exceção das bolachas com 8% de proteína, que apresentavam uma espessura menor. Relativamente aos diâmetros, observou-se uma grande variabilidade entre os vários grupos de bolachas. No 1º ensaio, as bolachas eram idênticas ao controlo mas, o diâmetro das bolachas com 4% de proteína são estatisticamente diferente do das com 2% de proteína. No 2º Ensaio as bolachas com 8% proteína são estatisticamente diferentes do controlo. Mais uma vez, não se verificou nenhuma tendência com o aumento da quantidade de proteína adicionada.

A fraturabilidade (N), de acordo com Pereira et al. (2013), é a força à qual se verifica a rutura da amostra, ou seja, a força à qual surge o primeiro pico no reograma. Nas condições utilizadas, apenas em algumas bolachas era detetado o pico correspondente à fraturabilidade e por isso os resultados não foram considerados para análise. A dureza (N), de acordo com Pereira et al. (2013), corresponde ao pico máximo que surge no reograma. Os valores obtidos para as diferentes bolachas variaram bastante. Fatores como o tempo de cozedura e heterogeneidade no diâmetro e espessura das bolachas poderiam estar na origem desta variabilidade. As bolachas com a percentagem mais elevada de proteína de *Tenebrio molitor* apresentaram o maior valor de dureza mas observou-se uma diminuição deste valor quando se adicionou especiarias. De acordo com os resultados obtidos, parece não existir uma correlação entre a dureza da bolacha e a percentagem de proteína incorporados. Os valores de dureza obtidos por Pereira et al. (2013) para “Bolacha Maria” são bastante superiores (98,99 - 154,11 N) aos obtidos nas bolachas preparadas neste trabalho.

Na figura seguinte encontra-se a imagem visual das diferentes bolachas produzidas e onde é evidente a diferença nas dimensões e na cor.

Figura 24 – Apresentação dos diferentes biscoitos e bolachas produzidas com larvas e diferentes % de proteína extraída de *Tenebrio molitor*



Legenda: Figura com letras a rosa: A) Biscoito sem proteína, B) Biscoito com proteína extraída após solubilização a 20°C, C) Biscoito com proteína extraída após solubilização a 50°C. Figura com letras a azul: A) Bolacha com 4% de larvas, B) Bolacha com 4% proteína, C) Bolacha com 2% proteína, D) Bolacha controlo 1.

5. CONCLUSÕES

As larvas de *Tenebrio molitor* apresentam um elevado teor proteico (18,0%) e lipídico (10,4%)., e a fração lipídica é constituída predominantemente por triacilgliceróis e ácidos gordos livres e pelos ácidos gordos por ácido oleico (18:1n9), ácido linoleico (18:2n6) e palmítico (16:0). A ingestão de larvas de *Tenebrio molitor* contribui com mais de 100% dos valores recomendado pela FAO para os aminoácidos histidina, treonina, fenilalanina e tirosina. As larvas apresentam baixo teor de contaminantes químicos, mas uma elevada carga de bactérias mesófilas, *Enterobactereaceas*, coliformes totais e bolores e leveduras (entre 7 e 5 log ufc/g), não tendo sido detetada a presença das bactérias patogénicas *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp.

As condições ótimas de extração das proteínas das larvas de *Tenebrio molitor* foram uma proporção água:larvas 1:20, pH de solubilização de 12, temperatura de 20 °C e tempo de agitação de 30min e levaram à obtenção de proteínas com características promissoras uma vez que, apresentaram propriedades funcionais semelhantes à proteína extraída de pescada-do-cabo e de proteína de soja.

A incorporação de diferentes percentagens de proteína extraída de *Tenebrio molitor* em bolachas de manteiga permitiu obter um produto aceitável e enriquecido em termos proteicos e lipídicos. Estas bolachas poderão ser uma opção de compra aos tipos de bolachas comercializadas.

As propriedades nutricionais e funcionais das proteínas extraídas das larvas de *Tenebrio molitor* permitem a sua utilização como ingrediente alimentar tornando-as numa fonte alternativa a outras proteínas com outras origens animal.

6. BIBIOGRAFIA

- Anna Jansson, Åsa Berggren (2015) *Insects as Food – Something for the future*. Uppsala: Swedish University of Agricultural Science.
- AOAC (1998 a). Tryptophan in foods and food and feed ingredients. *AOAC Official Method 988.15, Official Methods of Analysis* (16th ed.). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemistry, Chapter 45.4.04.
- AOAC (1998 b). Amino acids in feeds. *AOAC Official Method 994.12, Official Methods of Analysis* (16th ed.). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemistry, Chapter 4.1.11.
- Henderson, J. W.; Ricker, R. D.; Bidlingmeyer, B. A.; Woodward, C., 2000. Rapid, accurate, sensitive and reproducible analysis of amino acids; Agilent Publication 5980-1193EN; Agilent Technologies: Palo Alto, CA.
- Bandarra, N. M., Calhau, M. A., Oliveira, L., Ramos, M., Dias, M. da G., Bártoło, H., Faria, R. M., Fonseca, M. C., Gonçalves, J., Batista, I., Nunes, M. L. (2004). *Composição e valor nutricional dos produtos da pesca mais consumidos em Portugal*. Publicações avulsas do IPIMAR, 11.
- Batista, I., Pires, C., Nelhas, R., Godinho, V. (2006). Acid and alkaline-aided protein recovery from cape hake by-products. In: Luten, J.B., Jacobsen, C., Bekaert, K., Sæbø, A., Oehlenschläger, J. (Eds.), *Seafood research from fish to dish. Quality, safety and processing of wild and farmed fish*. Wageningen, Netherlands: Academic Publishers.
- Balti, R., Bougatef, A., El Hadj, Ali N., Zekri, D., Barkia, A., Nasri, M. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties and angiotensin I-converting enzyme-inhibitory activity of protein hydrolysates from cuttlefish (*Sepia officinalis*) by-products. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 90, 2006-2014.
- Beenackers, AD M. TH., Van der Horst, D. J. e Van Marrewijk, W. J. A. (1985). Insect lipids and lipoproteins, and their physiological processes. *Progress in Lipid Research*, 24, 19-67.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. (2009). *Food chemistry* (4th ed.). Berlin: Springer-Verlag.
- Belforti, M., Gai, F., Lussiana, C., Renna, M., Malfatto, V., Rotolo, L., De Marco, M., Dabbou, S., Schiavone, A., Zoccarato, I., Gasco, L. (2015). *Tenebrio molitor* meal in rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Diets: effects on animal performance, nutrient digestibility and chemical composition of fillets. *Italian Journal of Animal Science*, 14:4170, 670 – 676.
- Belluco, S., Losasso, C. Maggioletti, M., Alonzi, C. C., Paoletti, M. G., Ricci, S. (2013). Edible insects in a food safety and nutritional perspective: A critical review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12, 296 – 313.
- Bligh, E. G., Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–54.
- Bullard, B., Leonard, K. (1996). Modular proteins of insect muscle. *Advances in Biophysics*, 33, 211–221.
- Bureau Risicobeoordeling, onderzoeksprogrammering (2014). *Adisory report on the risk associated with the consumption of mass-reared insects*. Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority, Ministry of Economic Affairs.
- Chapagain, A.K., Hoekstra, A.Y. (2003). *Virtual water flows between nations in relation to trade in livestock and livestock products*. Value of Water Research Report Series No. 13. Holanda: UNESCO-IHE.
- CEN (2003). European Standard EN 14084. Foodstuffs – Determination of trace elements Determination of lead, cadmium, zinc, copper and iron by atomic absorption

- spectrometry (AAS) after microwave digestion. *CEN-European Committee for Standardization*, 16.
- Cho, M. Y., Choi, H. W., Moon, G. Y., Kim, M. H., Kwon, T. H., Homma, K. I. (1999). An 86 kDa diapause protein 1-like protein is a component of early staged encapsulation-relating proteins in coleopteran insect *Tenebrio molitor* larvae. *FEBS Letters*, 451(3), 303–307.
- Chow, C. K. (2008). *Fatty acids in foods and their health implications* (3rd ed.). Broken Sound Parkway NW: CRC Press.
- Cohen, Z., Von Shak, A., Richmond, A. (1988). Effect of environmental conditions on fatty acid composition of the red algae *Porphyridium cruentum*: correlation to growth rate. *Journal of Phycology*, 24, 328–332.
- Commission Regulation (EC) no. 1881 (2006). Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L364, 5-24.
- Commission Regulation (EC) N° 629 (2008). Amending Regulation (EC) N° 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L173, 6-9.
- Costa, S., Afonso, C., Bandarra, N. M., Gueifão, S., Castanheira, I., Carvalho, M. L., Cardoso, C., Nunes, M. L. (2013). The emerging farmed fish species meagre (*Argyrosomus regius*): How culinary treatment affects nutrients and contaminants concentration and associated benefit-risk balance. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 277-285.
- Costa, S., Afonso, C., Cardoso, C., Batista, I., Chaveiro, N., Nunes, M.L., Bandarra, N.M. (2015). Fatty acids, mercury, and methylmercury bioaccessibility in salmon (*Salmo salar*) using an in vitro model: Effect of culinary treatment. *Food Chemistry*, 185, 268–276.
- de Vries and Boer (2010). Comparing environmental impacts for livestock products: A review of life cycle. *Livestock Science*, 128, 1–11.
- Diener, S., Zurbrugg, C., Tockner, K. (2015). Bioaccumulation of heavy metals in the black soldier fly, *Hermetia illucens* and effects on its life cycle. *Journal of Insects as Food and Feed*, 1, 261-270.
- Diniz, F. m., Martin, A. M. (1997). Effects of the extent of enzymatic hydrolysis on functional properties of shark protein hydrolysate. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie (LWT)*, 30, 266–272.
- Durst, P. B. Johnson, D. V., Leslie, R. N., Shono, K. (2010). *Forest insects as food: humans bite back*. Bangkok: FAO of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific, 5-22.
- EFSA (2015). Risk profile related to production and consumption of insects as food and feed. *EFSA Journal*, 13, 4257, 1 – 60.
- Elpidina, E. N., Tsybina, T. A., Dunaevsky, Y. E., Belozersky, M. A., Zhuzhikov, D. P., Oppert, B. (2005). A chymotrypsin-like proteinase from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *Biochimie*, 87(8), 771–779.
- EPA (1998). Test method 7473: Mercury in solids and solutions by thermal decomposition, amalgamation and atomic absorption spectrometry. SW-846, *Environment Protection Agency*, 14p.
- FAO (1992). Fermented fish in Africa. A study on processing, marketing and consumption. *FAO Fisheries Technical Paper*, 329, 1-80.
(<http://www.fao.org/docrep/t0685e/T0685E04.htm>, consultado a 27.09.2016)
- FAO (2010). *Forest insects as food: humans bite back*. Proceedings of a workshop on Asia-Pacific resources and their potential for development, 1-231.
- FAO (2013). *Dietary protein quality evaluation in human nutrition*. Report of an FAO Expert Consultation, 1-66.
- FAO/WUR (2013). *Edible insects - future prospects for food and feed security*. FAO Forestry paper, 171-187.

- Ferreira, A. H., Marana, S. R., Terra, W. R., Ferreira, C. (2001). Purification, molecular cloning, and properties of a beta-glycosidase isolated from midgut lumen of *Tenebrio molitor* (Coleoptera) larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31, 1065–1076.
- Fink, M. D. (2007). Estimate of chitin in raw whole insects. *Zoo Biology*, 26, 105–115.
- Finke, M. D. (2002). Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *Zoo Biology*, 21, 269–285
- Folch, J., Lee, M., Sloane, G. H. (1956) - A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497 – 509.
- Gamage, A., Shahidi, F. (2007). Use of chitosan for the removal of metal ion contaminants and proteins from water. *Journal of food chemistry*, 104, 989–996.
- Ghaly, A.E., Alkoak, F.N. (2009). The yellow mealworm as a novel source of protein. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 4, 319-331.
- Gomes de Castro, A. (2003). *A química e a reologia no processamento dos alimentos*. Instituto Piaget, Lisboa:Tadinense.
- Horne, I., Haritos, V.S., Oakeshott, J. G. (2009). Comparative and functional genomics of lipases in holometabolous insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39, 547-567.
- INSA (2016). Tabela da composição de alimentos (TCA) acedido a julho 1, 2016, em: <http://www.insa.pt/SITES/INSA/PORTUGUES/AREASCIENTIFICAS/ALIMENTNUTRICA/APLICACOESONLINE/TABELAALIMENTOS/PESQUISAONLINE/Paginas/ListaAlfabetica.aspx>
- ISO 6888-1 (1999/Amd 1:2003). “Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) - Part 1: Technique using Baird-Parker agar médium”, 1-13.
- ISO 6887-3 (2003). “Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products”, 1-11.
- ISO 7218 (2007/Amd 1:2013). “Microbiology of food and animal feeding stuffs — General requirements and guidance for microbiological examinations”, 1-66.
- ISO 11133 (2014). “Microbiology of food, animal feeding stuffs and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media”, 1-94.
- ISO 11290-1 (1996). “Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* -- Part 1: Detection method”, 1-17.
- ISO 16649-2 (2001). “Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of -glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 2: Colony-count technique at 44 °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide”, 1-8.
- ISO 21527-1 (2008). “Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds - Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95”, 1-14.
- ISO 21528-2 (2004). “Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part 2: Colony-count method”, 1-10 for the enumeration of microorganisms – Colony-count technique at 30°C”, 1-9.
- ISO 4833-1 (2013). “Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique”, 1-9.
- Jongema, Y. (2015). Universidade de Wageningen, na Holanda. Acedido em Junho de 2016 Disponível em: <http://www.wageningenur.nl/en/ExpertiseServices/Chair-groups/PlantSciences/Laboratory-of-Entomology/Edible-insects/Worldwide-species-list.htm>

- Klunder, H. C., Wolkers-Rooijackers, J., Korpela, J. M., Nout, M. J. R. (2012). Microbiological aspects of processing and storage of edible insects. *Food Control*, 26, 628-631.
- Lakey, A., Ferguson, C., Labeit, S., Reedy, M., Larkins, A., Butcher, G., et al. (1990). Identification and localization of high molecular weight proteins in insect flight and leg muscle. *European Molecular Biology Organization Journal*, 9, 3459-3467.
- Lee, K. M., Lee, K. Y., Choi, H. W., Cho, M. W., Kwon, T. H., Kawabata, S., Lee, B. L. (2000). Activated phenoloxidase from *Tenebrio molitor* larvae enhances the synthesis of melanin by using a vitellogenin-like protein in the presence of dopamine. *European Journal of Biochemistry*, 267, 3695-3703.
- Lepage, G., Roy, C.C. (1986). Direct transesterification of all classes of lipids in a onestep reaction. *Journal of Lipid Research*, 27, 114-119.
- L'Hocine, Boye, J. I., Arcand, Y. (2006). Composition and functional properties of soy protein isolates prepared using alternative defatting and extraction procedures. *Journal of Food Science*, 71, 137-145.
- Mauldin, J. K., Lambremont, E. N., Graves, J. B. (1971). Principal lipid classes and fatty acids synthesized during growth and development of the beetle *Lyctus planicollis*. *Insect Biochemistry*, 1, 316-326.
- Miglietta, P.P., De Leo, F., Ruberti, M., Massari, S. (2015). Mealworms for food: A water footprint perspective. *Water*, 7, 6190-6203.
- Morales-Ramos, J.A., Rojas, M.G., Kay, S., Shapiro-Ilan, D.I., Tedders, W.L. (2012). Impact of adult weight, density, and age on reproduction of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Entomological Science*, 47, 208-220.
- Mørkøre, T., Vallet, J.L., Cardinal, M., Gomez-Guillen, M.C., Montero, P., Torrissen, O.J., Nortvedt, R., Sigurgisladottir, S., Thomassen, M.S. (2001). Fat content and fillet shape of atlantic salmon relevance for processing yield and quality of raw and smoked products. *Journal of Food Science*, 66, 1348-1354.
- Moure, A., Sineiro, J., Domínguez, H., Paraj, J. C. (2006). Functionality of oilseed protein products: A review. *Food Research International*, 39, 945-963.
- NP 2032 (2009). Norma Portuguesa Produtos da pesca e da aquicultura. Determinação do teor de cinza total, 2ª ed. *Instituto Português da Qualidade*. Lisboa
- NP 2282 (2009). Norma Portuguesa Produtos da pesca e da aquicultura. Determinação do teor de Humidade. *Instituto Português da Qualidade*. Lisboa
- Oonincx, D.G.A.B., de Boer, I.J.M. (2012). Environmental impact of the production of mealworms as a protein source for humans: a life cycle assessment. *PLOS ONE*, 7, e51145.
- Oonincx, D.G.A.B., van Itterbeeck, J., Heetkamp, M. J. W., van den Brand, H., van Loon, J., van Huis, A. (2010). An exploration on greenhouse gas and ammonia production by insect species suitable for animal or human consumption. *PLOS ONE*, 5, e14445.
- Pereira, D., Correia, P. M. R., Guiné, R. P. F. (2013). Analysis of the physical-chemical and sensorial properties of Maria type cookies. *Acta Chimica Slovaca*, 6, 269-280.
- Pimentel, D., Berger, B., Filiberto, D., Newton, M., Wolfe, B., Karabinakis, E., Clark, S., Poon, E., Abbett, E., Nandagopal, S. (2004). Water resources: agricultural and environmental issues. *BioScience*, 54, 909-918.
- Pires, C., Costa, S., Batista, A. P., Nunes, M. C., Raymundo, A., Batista, I. (2012). Properties of protein powder prepared from cape hake by-products. *Journal of Food Engineering*, 108, 268-275.
- Purves, W. K., Sadava, D., Orians, G. H., Heller, H. C. (2003). *Life the science of biology* (7thed.) Ligonier: Sinauer Associates and W. H. Freeman.
- RAPID'Salmonella (2015). "Validation Certificate for Alternative Method According to Standard EN ISO 16140:2003", *AFNOR*, certificate nº BRD 07/11-12/05.

- Ravzanaadii, N., Kim, Seong-Hyun, Choi, W.H., Hong, Seong-Jin Kim, N.J. (2012). Nutritional value of mealworm, *Tenebrio molitor* as food source. *International Journal of Industrial Entomology*, 25, pp. 93-98
- Resh, V.H., Cardé, R.T. (2003) *Encyclopedia of insects*. California: Academic press, an imprint of Elsevier Science.
- Rumpold, B.A., Schlüter, O.K. (2013). Potential and challenge of insects as an innovative source for food and Feed production. *Innovative Food science and Emerging Technologies*, 17, 1-11.
- Rutherford, S. M., Gilani, G. S. (2009). Amino acid analysis. Current protocols in protein science in *Wiley Interscience*, 11.9, 1-37.
- Saint-Denis, T., Goupy, J., (2004). Optimization of a nitrogen analyser based on the Dumas method. *Analytica Chimica Acta*, 515, 191–198.
- Santos, J. R. (2013). *Determinação do teor de fibra alimentar em produtos hortofrutícolas*. Tese de mestrado de Engenharia Alimentar: Instituto Superior de Agronomia.
- Sathivel, S., Smiley, S., Prinyawiwatkul, W., Bechtel, P. J. (2005). Functional and nutritional properties of red salmon (*Oncorhynchus nerka*) enzymatic hydrolysates. *Journal of Food Science*, 70, C401-C406.
- Siemianowska, E., Kosewska, A., Aljewicz, M., Skibniewska, K. A., Polak-Juszczak, L., Jarocki, A., Jędras, M. (2013). Larvae of mealworm (*Tenebrio molitor* L.) as european novel food. *Agricultural Sciences*, 4, 287-291.
- Silva, F. W. S., Araujo, L., Azevedo, D. O., Serrão, J. E., Elliot, S. L. (2016). Physical and chemical properties of primary defences in *Tenebrio molitor*. *Physiological Entomology*, 41, 121–126.
- Sritunyalucksana, K., Söderhäll, K. (2000). The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture*, 191, 53–69.
- Spang, B. (2013). *Insects as food: assessing the food conversion efficiency of the mealworm (Tenebrio molitor)*. Environmental study master thesis: The Evergreen State College.
- Sugar glide free (2016). DIY Insect Breeding acedido a agosto 8, 2016, em: <http://www.sugarglidertree.com/biology/diy-insect-breeding>
- Superior Health Council (2014). *Food safety aspects of insects intended for human consumption*. Scientific Committee of the Federal Agency for the safety of food Chain, 9160, 1-23.
- Tomé, A., S., A. (2012). *Avaliação das propriedades gelificantes e emulsionantes de misturas de proteínas de pescado e de proteínas vegetais*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Alimentar – Processamento de alimentos: Instituto Superior de Agronomia - Universidade Técnica de Lisboa
- Tzompa-Sosa, D. A., Yi, L., van Valenberg, H. J.F., van Boekel, M. A. J. S., Lakemond, C. M. M., (2014). Insect lipid profile: aqueous versus organic solvent-based extraction methods. *Food Research International*, 62, 1087–1094
- van Broekhoven, S., Oonincx, D.G.A.B., van Huis, A., van Loon, J.J.A. (2015). Growth performance and feed conversion efficiency of three edible mealworm species. *Journal of Insect Physiology*, 73, 1-10.
- van Huis, A. 2013. Potential of insects as food and feed in assuring food security. *Annual Review of Entomology*, 58, 563–583.
- Vijver, M., Jager, T., Posthuma, L., Peijnenburg, W. (2003). Metal uptake from soils and soil-sediment mixtures by larvae of *Tenebrio molitor* (L.) (Coleoptera). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54, 277–289.
- Wemans, M. da P. C. da C. (2015). *Insetos comestíveis - Avaliação Nutricional de duas espécies comercializadas em Portugal*. Tese de mestrado em Engenharia Alimentar Ramo de Processamento dos Alimentos Alimentar – Instituto Superior de Agronomia.
- Wilkinson, J.M. (2011). Re-defining efficiency of feed use by livestock. *Animal*, 5, 1014-1022.

- William, P. (2007). Nutritional composition of red meat. *Nutrition & Dietetics*, 64, S113–S119.
- Wu, G. (2009). Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*, 37, 1–17.
- Xing-qian, Y., Dong-hong, L., Cui, H. (2001). Some factors effects on the solubility of protein from yellow mealworm larvae (*Tenebrio molitor*) larvae. *Journal of Zhejiang University Science*, 2, 436 – 438.
- Yang-Teng, Xu, Zhang, Jian-xin, Song, Zhen-Zhen, Sun, Yong (2014). Optimization of extraction of proteins from larvae of the black fly soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera:Stratiomyidae), using response surface methodology. *Acta Entomologica sinica*, 57, 401-410.
- Yi, L., Lakemond, C. M.M., Sagis, L. M.C., Eisner-Schadler, V., van Huis, A., van Boekel, M.A.J.S. (2013). Extraction and characterization of protein fractions from five insect species. *Food Chemistry*, 141, 3341–3348.
- Zhao, X., Vázquez-Gutiérrez, J. I., Johansson, D. P., Landberg, R., Langton, M. (2016). Yellow Mealworm Protein for Food Purposes - Extraction and Functional Properties. *PLoS ONE*, 11(2), 1-17.
- Zielińska, E., Baraniak, B., Karaś, M., Rybczyńska, K., Jakubczyk, A. (2015). Selected species of edible insects as a source of nutrient composition. *Food Research International*, 77, 460-466.

7. ANEXOS

Anexo 1 – Resultados de G' e G'' obtidos durante o aquecimento de 20°C a 90 °C e arrefecimento de 90 °C a 20 °C, para a proteína solubilizada a 20 °C e a 50 °C.

Aquecimento 20-90°C (1°C/min)						Arrefecimento 90-5°C (1°C/min)					
Proteína Solubilizada a 20° C			Proteína Solubilizada a 50° C			Proteína Solubilizada a 20° C			Proteína Solubilizada a 50° C		
T (°C)	G'	G''	T (°C)	G'	G''	T (°C)	G'	G''	T (°C)	G'	G''
22,3	526,9	151,7	22,4	290,6	69,7	87,2	598,3	95,3	87,2	375,3	63,7
24,7	500,4	137,5	24,7	284,4	66,3	84,4	610,6	101,9	84,3	414,6	72,4
27,0	479,3	128,7	27,0	270,7	60,9	81,5	651,9	110,9	81,5	466,6	85,0
29,4	472,0	124,4	29,3	260,0	57,1	78,7	668,7	117,6	78,7	520,8	98,5
31,7	474,0	122,3	31,7	250,6	53,4	75,9	699,4	124,9	75,9	587,0	113,8
34,0	472,9	119,2	34,0	250,5	52,5	73,1	738,1	132,9	73,0	663,8	135,2
36,3	487,6	119,1	36,2	258,7	52,2	70,1	764,9	139,9	70,2	749,0	159,5
38,6	517,6	125,8	38,6	268,2	60,0	67,3	791,8	147,4	67,4	860,7	190,3
40,9	595,5	136,8	41,0	274,0	43,3	64,5	817,7	156,1	64,6	999,2	230,1
43,3	590,0	125,2	43,3	287,5	55,1	61,7	846,5	164,9	61,7	1123,0	268,4
45,6	602,6	121,6	45,6	293,1	53,4	58,8	874,0	174,4	59,0	1264,0	309,2
48,0	573,9	120,1	47,9	293,1	50,2	56,1	905,1	188,1	56,0	1435,0	360,5
50,3	586,2	100,8	50,3	301,1	54,7	53,2	940,0	201,1	53,3	1617,0	416,4
52,7	592,4	117,5	52,6	294,0	50,3	50,4	975,8	216,5	50,4	1805,0	470,8
55,0	622,9	115,9	54,9	291,7	50,2	47,6	1015,0	232,9	47,5	1997,0	524,1
57,3	656,1	126,8	57,3	291,5	52,1	44,7	1059,0	252,9	44,7	2220,0	592,1
59,6	683,6	110,6	59,6	298,9	51,9	41,9	1102,0	272,2	41,9	2462,0	652,4
61,9	683,9	120,4	61,9	294,0	54,5	39,1	1152,0	291,9	39,1	2729,0	724,5
64,3	645,0	104,3	64,3	294,7	50,9	36,2	1218,0	318,9	36,3	3029,0	807,9
66,6	659,0	110,2	66,6	289,8	47,9	33,3	1283,0	343,4	33,4	3390,0	877,1
68,9	677,1	102,3	68,9	295,0	50,7	30,6	1355,0	373,7	30,5	3804,0	985,4
71,2	683,4	118,7	71,3	285,8	49,4	27,8	1454,0	409,0	27,7	4247,0	1106,0
73,6	782,7	155,4	73,6	282,9	47,4	24,9	1545,0	446,9	24,9	4727,0	1210,0
75,9	745,5	119,5	76,0	284,4	46,7	22,1	1681,0	489,0	22,1	5224,0	1343,0
78,3	648,4	102,7	78,2	278,3	47,5	19,3	1877,0	559,2	19,3	5889,0	1497,0
80,6	611,1	95,6	80,6	273,3	48,9	16,5	2029,0	610,1	16,4	6568,0	1674,0
82,9	646,1	96,9	82,9	271,2	42,7	13,6	2205,0	684,2	13,7	7494,0	1937,0
85,2	569,9	84,1	85,2	269,6	42,0	10,8	2402,0	741,6	10,9	8607,0	2234,0
87,6	544,8	85,3	87,6	259,0	44,2	8,0	2547,0	814,1	8,0	9776,0	2563,0
89,9	585,6	81,2	89,9	251,2	41,8	5,1	2653,0	859,1	5,2	11050,0	2908,0

Anexo 2 - Resultados de G' e G'' obtidos durante a maturação e varrimento de frequência (espectro mecânico) a 5 °C, para a proteína solubilizada a 20 °C e a 50 °C.

Maturação a 5°C, 5horas						Espectro mecânico: T= 5°C					
Proteína Solubilizada a 20° C			Proteína Solubilizada a 50° C			Proteína Solubilizada a 20° C			Proteína Solubilizada a 50° C		
t (s)	G'	G''	t (s)	G'	G''	f (Hz)	G'	G''	f (Hz)	G'	G''
900	2692	890,5	900	14480	3491	0,01	1461	264,6	0,01	6304	1298
1800	2711	898,1	1800	16290	3695	0,01	1509	273,5	0,01	6722	1145
2700	2690	889,7	2700	16340	3626	0,02	1563	298,4	0,02	7009	1219
3600	2676	892,3	3600	15870	3542	0,03	1615	335,2	0,03	7178	1260
4499	2672	883,7	4499	15220	3247	0,05	1688	359,0	0,05	7509	1392
5399	2690	891,0	5399	14350	3040	0,07	1763	386,9	0,07	7803	1474
6300	2684	892,3	6300	12980	2785	0,10	1849	419,7	0,10	8175	1496
7200	2697	896,4	7200	12440	2558	0,15	1945	470,7	0,15	8458	1562
8099	2725	903,9	8099	12290	2520	0,22	2045	532,4	0,22	8863	1601
8999	2723	901,9	8999	12050	2478	0,32	2161	594,4	0,32	9238	1682
9900	2740	910,1	9900	11760	2380	0,46	2289	669,2	0,46	9605	1775
10800	2729	903,4	10800	11580	2414	0,68	2444	760,7	0,68	9989	1926
11700	2724	899,5	11700	11200	2264	1,00	2614	860,8	1,00	10430	2052
12600	2713	897,4	12600	10900	2189	1,47	2804	978,0	1,47	10910	2177
13500	2719	896,8	13500	10720	2142	2,15	3033	1122,0	2,15	11410	2365
14400	2675	881,2	14400	10630	2122	3,16	3280	1280,0	3,16	12000	2608
15300	2643	869,8	15300	10630	2097	4,64	3599	1506,0	4,64	12640	2869
16200	2631	864,7	16200	10630	2096	6,81	3882	1679,0	6,81	13170	3042
17100	2661	870,9	17100	10580	2095	10,00	4251	1929,0	10,00	13940	3371
18000	2628	864,0	18000	10460	2053	14,68	4695	2256,0	14,68	14770	3770
						21,54	5145	2642,0	21,54	15760	4210
						31,62	5813	3056,0	31,62	16830	4798
						46,42	6596	3590,0	46,42	17990	5474
						68,13	6652	3735,0	68,13	19680	6420
						100,00	9486	167,7	100,00	20600	7571

Anexo 3 – Modelo da ficha de análise sensorial dos biscoitos

Nome: _____ Idade: _____ Data: _____

Avalie, para cada amostra, as várias características abaixo indicadas, usando a seguinte escala de avaliação:

- 1 Desgostei muito
- 2 Desgostei moderadamente
- 3 Desgostei ligeiramente
- 4 Indiferente
- 5 Gostei ligeiramente
- 6 Gostei moderadamente
- 7 Gostei muito

Atributo	Amostra A	Amostra B	Amostra C
Cor			
Aparência			
Textura			
Sabor			
Qualidade Geral			

Observações:

INTENÇÃO DE COMPRA:

Compraria frequentemente _____

Compraria ocasionalmente _____

Compraria raramente _____

Não compraria _____

Observações: _____

Anexo 4 – Modelo da ficha de análise sensorial das bolachas

Nome: _____ Idade: _____ Data: _____

Avalie, para cada amostra, as várias características abaixo indicadas, usando a seguinte escala de avaliação:

- 8 Desgostei muito
- 9 Desgostei moderadamente
- 10 Desgostei ligeiramente
- 11 Indiferente
- 12 Gostei ligeiramente
- 13 Gostei moderadamente
- 14 Gostei muito

Atributo	Amostra A	Amostra B	Amostra C
Cor			
Aparência			
Textura			
Crocância			
Sabor			
Qualidade Geral			

Observações:

INTENÇÃO DE COMPRA:

Compraria frequentemente _____

Compraria ocasionalmente _____

Compraria raramente _____

Não compraria _____

Observações: _____

Anexo 5 – Avaliação sensorial por parte do painel de provadores dos biscoitos com e sem a proteína extraída de *Tenebrio molitor* após solubilização a 20 °C e a 50 °C

Provador	Idade	Sexo	Amostra	Cor	Aparência	Textura	Sabor	Aroma	Avaliação global	Intenção compra	Observações
1	60	F	Biscoitos controlo	7	7	5	6	4	5	3	Sabor agradável a leite ou adoçado
			Biscoitos com proteína solubilizada a 20°C	6	6	3	3	4	4	3	Consistência quebradiça e um pouco seca
			Biscoitos com proteína solubilizada a 50°C	6	7	3	3	4	4	3	Consistência quebradiça e um pouco seca
2	55	M	Biscoitos controlo	6	6	6	5	5	5	3	Parecida com a bolacha Maria
			Biscoitos com proteína solubilizada a 20°C	6	6	6	5	5	5	3	Sabor residual adstringente
			Biscoitos com proteína solubilizada a 50°C	6	6	6	5	5	5	3	Sabor residual adstringente
3	52	F	Biscoitos controlo	7	7	6	6	4	6	4	
			Biscoitos com proteína solubilizada a 20°C	6	7	6	5	4	5	3	
			Biscoitos com proteína solubilizada a 50°C	6	7	6	6	4	6	3	
4	43	F	Biscoitos controlo	7	7	6	7	7	7	4	
			Biscoitos com proteína solubilizada a 20°C	6	6	6	5	6	6	3	Sabor amargo
			Biscoitos com proteína solubilizada a 50°C	6	5	6	6	6	5	3	Sabor amargo
5	45	M	Biscoitos controlo	5	5	4	6	5	5	3	Amostras um pouco secas
			Biscoitos com proteína solubilizada a 20°C	4	5	4	6	5	5	3	Amostras um pouco secas
			Biscoitos com proteína solubilizada a 50°C	4	5	4	6	5	5	3	Amostras um pouco secas
6	46	M	Biscoitos controlo	4	6	7	7	4	7	4	
			Biscoitos com proteína solubilizada a 20°C	4	7	6	5	4	6	4	Amostra com travo picante
			Biscoitos com proteína solubilizada a 50°C	4	7	6	5	4	6	4	Amostra com um travo picante
7	29	F	Biscoitos controlo	6	6	5	5	5	5	1	
			Biscoitos com proteína solubilizada a 20°C	6	6	6	5	6	6	4	
			Biscoitos com proteína solubilizada a 50°C	6	6	5	6	5	5	3	
8	27	F	Biscoitos controlo	7	7	3	7	7	6	4	
			Biscoitos com proteína solubilizada a 20°C	7	7	3	6	7	5	3	Bolachas muito secas
			Biscoitos com proteína solubilizada a 50°C	7	6	3	6	7	5	3	Bolachas muito secas
9	26	F	Biscoitos controlo	6	5	3	5	4	5	3	
			Biscoitos com proteína solubilizada a 20°C	6	6	5	6	5	6	4	
			Biscoitos com proteína solubilizada a 50°C	4	3	3	4	4	4	3	Menos saborosa
10	26	F	Biscoitos controlo	7	7	7	7	7	7	4	
			Biscoitos com proteína solubilizada a 20°C	7	7	6	6	6	6	3	
			Biscoitos com proteína solubilizada a 50°C	7	7	6	6	7	6	3	
11	22	F	Biscoitos controlo	7	6	5	7	4	7	4	
			Biscoitos com proteína solubilizada a 20°C	3	5	3	5	4	5	3	Muito sabor a torrado
			Biscoitos com proteína solubilizada a 50°C	6	6	2	4	4	4	1	Não sentia muito sabor
12	52	F	Biscoitos controlo	6	6	2	4	4	3	3	Textura "enfarinhada"
			Biscoitos com proteína solubilizada a 20°C	5	5	2	2	4	---	1	Sabor amargo e textura "enfarinhada"
			Biscoitos com proteína solubilizada a 50°C	5	5	3	3	4	---	1	Sabor amargo e textura "enfarinhada"

Anexo 6 - Avaliação sensorial por parte do painel de provadores das bolachas sem e com a adição de 4% de Larvas de *Tenebrio molitor* e com a adição de 2% e 4% de proteína extraída de *Tenebrio molitor*

Provador	Idade	Sexo	Atributo								Intenção compra	Observações
			Amostra	Cor	Aparência	Textura	Crocancia	Sabor	Aroma	Avaliação global		
1	60	F	Com 2% Larvas	7	7	6	6	5	5	5	3	Sensação de acidez na garganta e picante na ponta da língua
			Com 4% Proteína	5	5	5	5	2	3	2	1	
			Com 2% Proteína	6	5	6	6	2	3	2	1	
			Controlo	7	6	6	6	4	5	4	2	
2	55	M	Com 2% Larvas	6	6	6	6	6	6	6	3	Não denota diferenças significativas nos atributos. Sensação de adstringência e sabor a fermento.
			Com 4% Proteína	6	6	6	6	6	5	6	3	
			Com 2% Proteína	6	6	5	6	6	5	6	3	
			Controlo	6	6	6	6	6	6	6	3	
3	53	F	Com 2% Larvas	7	7	5	5	5	4	6	2	
			Com 4% Proteína	7	7	6	6	5	4	6	3	
			Com 2% Proteína	7	7	6	6	6	4	7	3	
			Controlo	7	7	6	6	6	4	7	3	
4	50	F	Com 2% Larvas	3	3	3	7	1	3	1	1	Sensação picante após degustação
			Com 4% Proteína	7	7	7	7	6	3	7	2	
			Com 2% Proteína	6	5	7	7	7	7	5	3	
			Controlo	5	5	7	7	7	6	5	3	
5	46	M	Com 2% Larvas	4	6	7	7	6	4	6	3	Todas as bolachas muito saborosas
			Com 4% Proteína	4	6	7	7	7	4	7	3	
			Com 2% Proteína	4	6	7	7	7	4	7	3	
			Controlo	4	6	6	6	6	4	7	3	
6	43	F	Com 2% Larvas	3	3	6	5	3	5	4	1	Sabor estranho no final
			Com 4% Proteína	6	7	6	6	7	7	6	3	
			Com 2% Proteína	5	6	6	6	7	7	6	3	
			Controlo	7	7	6	6	7	6	6	3	
7	37	F	Com 2% Larvas	7	6	6	7	6	7	6	3	Sabor picante na boca
			Com 4% Proteína	7	6	6	7	7	7	7	3	
			Com 2% Proteína	7	6	5	6	5	7	6	1	
			Controlo	7	6	6	6	7	7	6	2	
8	35	F	Com 2% Larvas	6	6	7	7	6	6	5	2	
			Com 4% Proteína	7	7	6	6	6	6	6	3	
			Com 2% Proteína	7	7	7	7	7	7	7	3	
			Controlo	7	7	6	7	6	6	6	3	
9	33	F	Com 2% Larvas	5	5	6	7	5	6	5	2	Bolachas mais finas e mais crocantes
			Com 4% Proteína	6	5	6	6	7	6	6	3	
			Com 2% Proteína	7	5	7	7	6	6	6	3	
			Controlo	7	7	6	6	6	5	6	3	

Anexo 6 - Avaliação sensorial por parte do painel de provadores das bolachas sem e com a adição de 4% de Larvas de *Tenebrio molitor* e com a adição de 2% e 4% de proteína extraída de *Tenebrio molitor* (Continuação)

Provador	Idade	Sexo	Atributo							Avaliação global	Intenção compra	Observações
			Amostra	Cor	Aparência	Textura	Crocância	Sabor	Aroma			
10	32	F	Com 2% Larvas	6	7	2	2	4	4	4	2	Muito doce
			Com 4% Proteína	3	3	7	7	7	7	6	3	Aspeto menos apelativos mas gosta muito da crocância e sabor
			Com 2% Proteína	7	7	7	7	7	7	7	3	
			Controlo	6	4	2	2	4	4	3	2	Muito Doce
11	29	F	Com 2% Larvas	7	7	5	6	7	6	5	1	
			Com 4% Proteína	5	5	3	3	7	6	3	1	Cor mais clara
			Com 2% Proteína	7	7	7	7	7	7	7	3	
			Controlo	7	7	5	6	7	6	6	1	
12	28	F	Com 2% Larvas	6	6	7	7	7	6	6	3	Sensação picante
			Com 4% Proteína	6	7	6	6	6	6	6	3	
			Com 2% Proteína	6	6	6	7	7	7	7	3	
			Controlo	7	7	7	7	7	7	7	3	
13	22	F	Com 2% Larvas	5	3	4	5	5	7	5	2	
			Com 4% Proteína	6	7	2	2	5	4	6	3	Travo muito picante
			Com 2% Proteína	6	7	6	7	5	4	6	3	
			Controlo	5	4	6	3	2	4	3	1	

Anexo 7 - Avaliação sensorial por parte do painel de provadores das bolachas sem e com a adição de 8% de proteína extraída de *Tenebrio molitor*

Provador	Idade	Sexo	Amostra	Atributo				Sabor	Aroma	Avaliação global	Intenção compra	Observações
				Cor	Aparência	Textura	Crocância					
1	58	M	Com 8% Proteína c/especiarias	7	7	5	2	5	5	5	3	Sabor a Farinha
			Controlo	7	7	6	5	5	5	6	3	
			Com 8% Proteína	7	7	7	7	7	7	7	4	
2	50	F	Com 8% Proteína c/especiarias	6	7	7	5	5	6	6	3	Sabor intenso a canela
			Controlo	7	7	6	6	6	6	6	4	
			Com 8% Proteína	7	7	6	6	6	5	6	3	
3	53	F	Com 8% Proteína c/especiarias	7	7	7	6	7	6	7	4	
			Controlo	7	7	6	6	6	4	6	4	
			Com 8% Proteína	6	6	6	7	5	4	5	3	
4	46	M	Com 8% Proteína c/especiarias	6	6	6	6	5	4	5	3	
			Controlo	7	7	7	7	7	4	7	4	
			Com 8% Proteína	6	6	7	7	7	4	6	4	
5	45	M	Com 8% Proteína c/especiarias	5	6	5	4	6	6	6	3	
			Controlo	6	6	6	5	6	5	6	3	
			Com 8% Proteína	5	6	6	6	6	5	6	3	
6	45	F	Com 8% Proteína c/especiarias	7	4	7	6	7	7	7	4	Textura, aroma e crocância conjugaram na perfeição
			Controlo	4	5	3	2	4	2	4	1	
			Com 8% Proteína	5	5	2	2	4	2	2	1	
7	43	F	Com 8% Proteína c/especiarias	6	7	7	6	2	5	2	1	Não gostou do sabor residual
			Controlo	7	6	6	6	6	5	6	4	
			Com 8% Proteína	6	6	5	5	2	5	2	1	
8	37	F	Com 8% Proteína c/especiarias	3	6	7	6	7	7	6	4	Cor muito escura, textura mais macia e saborosa
			Controlo	6	7	6	7	6	7	5	3	
			Com 8% Proteína	5	6	5	7	6	5	6	3	
9	35	F	Com 8% Proteína c/especiarias	7	7	6	6	7	7	7	4	
			Controlo	6	6	7	7	6	6	6	3	
			Com 8% Proteína	6	6	7	7	7	6	6	3	
10	30	F	Com 8% Proteína c/especiarias	6	6	4	3	4	3	4	1	Não gosta do sabor a canela
			Controlo	6	6	5	4	6	6	5	3	
			Com 8% Proteína	6	6	5	5	6	6	6	3	
11	28	M	Com 8% Proteína c/especiarias	6	6	6	6	7	7	6	4	
			Controlo	6	6	5	5	5	5	5	3	
			Com 8% Proteína	6	6	7	7	7	7	7	4	
12	26	F	Com 8% Proteína c/especiarias	7	7	6	6	6	7	6	3	
			Controlo	7	7	6	6	3	6	6	1	
			Com 8% Proteína	7	7	7	7	7	6	7	4	
13	25	F	Com 8% Proteína c/especiarias	6	6	5	5	5	6	6	3	
			Controlo	6	6	6	7	5	6	6	3	
			Com 8% Proteína	6	6	6	7	6	7	7	4	
14	22	F	Com 8% Proteína c/especiarias	5	5	3	2	3	4	5	3	
			Controlo	7	7	5	5	2	5	3	1	
			Com 8% Proteína	6	6	5	6	6	4	7	4	